

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL COMPLEJO EsxG·EsxH EN LA
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium smegmatis*
COMO MODELO EXPERIMENTAL DE *M. tuberculosis***

POR

Q.B.P. ALEJANDRA BORREGO LOYA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA**

ENERO, 2019

EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL COMPLEJO EsxG·EsxH EN LA
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium*
smegmatis COMO MODELO EXPERIMENTAL DE *M. tuberculosis*

Comité de tesis

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Presidente

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Secretario

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dr. José Santos García Alvarado
Vocal

Dra. Katia Peñuelas Urquides
Vocal

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL COMPLEJO EsxG-EsxH EN LA
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium*
smegmatis COMO MODELO EXPERIMENTAL DE *M. tuberculosis*

Dirección de Tesis

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Director Interno

Dra. Katia Peñuelas Urquides

Directora Externa

EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DEL COMPLEJO EsxG·EsxH EN LA
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium*
smegmatis COMO MODELO EXPERIMENTAL DE *M. tuberculosis*

Por

Q.B.P Alejandra Borrego Loya

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. Katia Peñuelas Urquides.

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero

Director Interno

Dra. Katia Peñuelas Urquides

Directora Externa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado, otorgándome la beca con número de registro 818895 y a la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por aceptarme como estudiante de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología.

Agradezco al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, por permitir el desarrollo de esta investigación, bajo el proyecto: Relación de la expresión de los genes *esxG* y *esxH* con la farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*, con número de registro: R-2015-1906-6 y de financiamiento: FIS/IMSS/PROT/G15/1457, así mismo por el apoyo económico complementario IMSS otorgado con el número de matrícula 97205586.

Agradezco a la Dra. Katia Peñuelas y al Dr. Mario Bermúdez, por abrirme las puertas de su laboratorio, gracias por su confianza, espero haber cumplido con las expectativas, gracias por todos los conocimientos transmitidos y por siempre estar disponibles con una actitud positiva para ayudarme con los problemas en el laboratorio. Agradezco a la Dra. Laura González y la Dra. María Elena Camacho, por darme consejos cuando las cosas parecían no tener solución.

Gracias a la Dra. Licet Villarreal, por guiarme con la Dra, Katia y el Dr. Juan Francisco Contreras, a quien agradezco por aceptarme en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas como hija adoptiva, por sus conocimientos y consejos que me ayudaron a crecer durante la maestría.

Agradezco a mis padres Sofía Loya y Fernando Borrego, no existen palabras suficientes para agradecer todo el apoyo y amor que me han brindado durante estos años para seguir superándome profesionalmente, y a mis hermanos Jesús y Fernando por sus palabras de aliento, siempre están todos en mi corazón y aunque estemos separados siempre habrá algo más grande que nos une, el amor. La familia perdura a pesar de la distancia, las diferencias y el tiempo, los amo.

Agradezco al equipo TB por su apoyo incondicional, a mis amigos del laboratorio y de maestría, quienes se convirtieron en mi familia, a todos ustedes los quiero mucho, les deseo mucho éxito en su vida profesional y personal. Por último, agradezco al amor de mi vida, Francisco Rodríguez, no cabe duda de que la distancia solo es un obstáculo para aquel que lo quiera ver de esa forma. El amor todo lo sufre, todo lo cree, todo lo espera, todo lo soporta (1 Corintios 13:7).

DEDICATORIA

Para mi familia, mi fuente de poder, amor y felicidad

*Para mi maestra la Dra. Katia Peñuelas Urquides,
Confiar en ti mismo no garantiza el éxito, pero no hacerlo
garantiza el fracaso. Albert Bandura*

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES:.....	3
2.1 Tuberculosis	3
2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.3 Epidemiología	8
2.4 Tratamiento	10
2.5 Fármacos de primera línea	11
2.6 Fármacos de segunda línea.....	12
2.7 Farmacorresistencia.....	13
2.8 Sistemas de secreción ESX	18
2.9 Características y funciones de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> de <i>M. tuberculosis</i>	20
2.10 <i>Mycobacterium smegmatis</i> como cepa modelo de <i>M. tuberculosis</i>	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL	25
5.1 Objetivos particulares.....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Cultivo y mantenimiento de <i>M. smegmatis</i>	26
6.2 Clonación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en el vector pET101/D-TOPO.....	26
6.3 Subclonación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en el vector pMV261 en <i>Escherichia coli</i>	26
6.4 Caracterización de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	27
6.5 Purificación del DNA plasmídico de <i>E. coli</i> DH5 α -pMV261- <i>esxG:esxH</i>	30
6.6 Transformación de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	30
6.7 Extracción de RNA total de <i>M. smegmatis</i> y RT-PCR punto final	31
6.8 Western Blot del complejo EsxG-EsxH	31
6.9 Evaluación del efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG-EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en <i>M. smegmatis</i>	32

6.10	Análisis estadístico.....	33
7.	RESULTADOS.....	34
7.1	Clonación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en el vector pET101/D-TOPO.....	34
7.2	Subclonación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en el vector pMV261.....	35
7.3	Caracterización de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	36
7.4	Purificación del DNA plasmídico de <i>E. coli</i> DH5 α -pMV261- <i>esxG:esxH</i>	42
7.5	Transformación de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	43
7.6	Extracción de RNA total de <i>M. smegmatis</i> y RT-PCR punto final	44
7.7	Western Blot del complejo EsxG·EsxH.....	46
7.8	Evaluación del efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en <i>M. smegmatis</i>	49
8.	DISCUSIÓN	55
9.	CONCLUSIONES	60
10.	PERSPECTIVAS.....	61
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	62
12.	RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Indicaciones de retratamiento para pacientes con TB activa.	10
Tabla 2. Fármacos antituberculosos de segunda línea clasificados por grupos	12
Tabla 3. Mutaciones de los genes relacionados con resistencia en <i>M. tuberculosis</i>	15
Tabla 4. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes <i>esxG:esxH</i>	27
Tabla 5. Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR para la caracterización de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	28
Tabla 6. Mezcla para la reacción de marcaje	29
Tabla 7. Rango de concentración de los fármacos en el método de microdilución en placa para <i>M. smegmatis</i>	33
Tabla 8. Cuantificación y pureza del RNA total de cepas de <i>M. smegmatis</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infección y desarrollo de la TB clínica causada por <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 2. Esquema de los componentes celulares del granuloma.....	5
Figura 3. Morfología microscópica y macroscópica de <i>M. tuberculosis</i>	7
Figura 4. Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	8
Figura 5. Tasas de mortalidad estimadas por tuberculosis, excluyendo las muertes por tuberculosis en personas con VIH en el 2017	9
Figura 6. Porcentaje de casos nuevos de TB RR/MFR en el 2017	14
Figura 7. Genes diferencialmente expresados en una cepa sensible y una multifarmacorresistente de <i>M. tuberculosis</i> por RT-qPCR.....	17
Figura 8. Expresión de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en 24 aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> agrupados según su perfil de resistencia a fármacos, analizados mediante RT- qPCR ...	18
Figura 9. Organización de los genes que componen el locus del sistema ESX-3.....	20
Figura 10. Programa para la amplificación de los genes <i>esxG:esxH</i>	28
Figura 11. Programa para la amplificación de los fragmentos que definen la orientación del inserto en el vector pMV261- <i>esxG:esxH</i>	29
Figura 12. Condiciones de la reacción de marcaje.....	30
Figura 13. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pET101/D-TOPO- <i>esxG:esxH</i>	34
Figura 14. Amplificación por PCR de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> a partir del DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pET101/D-TOPO- <i>esxG:esxH</i>	34
Figura 15. Digestión enzimática de la construcción pET101/D-TOPO- <i>esxG:esxH</i> y del vector pMV261 con <i>BamHI</i>	35
Figura 16. Purificación del fragmento de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> y del vector pMV261 linearizado.....	35
Figura 17. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	36
Figura 18. Amplificación por PCR de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> a partir del DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	36

Figura 19. Esquema para la identificación de la orientación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en el vector pMV261 por PCR.....	37
Figura 20. Identificación de la orientación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en el vector pMV261 por PCR.....	38
Figura 21. Mapa de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH in silico</i>	39
Figura 22. Alineamiento de las secuencias obtenidas comparada con la secuencia de la construcción <i>in silico</i> pMV261- <i>esxG:esxH</i>	41
Figura 23. Secuenciación automatizada de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	42
Figura 24. Purificación de la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	42
Figura 25. Transformación de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	43
Figura 26. Caracterización por PCR punto final del candidato 1 transformado con la construcción pMV261- <i>esxG:esxH</i>	44
Figura 27. Extracción de RNA total de cepas de <i>M. smegmatis</i> tratado con <i>DNaseI</i>	45
Figura 28. Amplificación del gen constitutivo <i>sigA</i>	46
Figura 29. Amplificación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i>	46
Figura 30. Western Blot de la proteína EsxG de la cepa <i>M smegmatis</i> -pMV261- <i>esxG:esxH</i>	47
Figura 31. Western Blot de la proteína EsxG	48
Figura 32. Western Blot de la proteína EsxH de la cepa <i>M smegmatis</i> -pMV261- <i>esxG:esxH</i>	49
Figura 33. Ensayo de reducción de resazurina por microdilución en placa en la cepa <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	50
Figura 34. Ensayo de reducción de resazurina por microdilución en placa.....	51
Figura 35. Curva de crecimiento.....	52
Figura 36. Curva de crecimiento con el fármaco de primera línea RIF.....	53
Figura 37. Curva de crecimiento con el fármaco de primera línea INH.....	54

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C Grado Centígrado

μg Microgramo

μL Microlitro

μM Micromolar

μFD Microfaradio

ADC (*Bovine Albumin, Dextrose, Catalase*) Albumina bovina, dextrosa, catalasa

ATCC *American Type Culture Collection*

BCG Bacilo de Calmette-Guérin

CFP10 (*Culture filtrate antigen 10 kDa*) Proteína filtrada de cultivo de 10 kDa

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

d Días

DNA (*Desoxyribonucleic acid*) ácido desoxiribonucleico

EEA1 Antígeno endosomal específico 1

EMB Etambutol

ESAT6 (*Early secreted antigenic target*) antígeno de secreción temprana de 6kDa

ESCRT complejo de clasificación endosomal del huésped requerido para el transporte

g Gramo

h Hora

kDa Kilodalton

kV Kilovoltios

IdeR Represor transcripcional dependiente de hierro

IL-12 Interleucina 2

INH Isoniazida

LAM Lipoarabinomanano

LB Luria Bertani

LcT Linfocito T

MFR Multifarmacorresistente

MntR Regulador de absorción de zinc

MTC (*Mycobacterium tuberculosis complex*) Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

mg Miligramo

min Minutos
mL Mililitro
mM Milimolar
NF (*Nuclease-Free*) libre de nucleasas
ng Nanogramos
OADC (*Oleic acid, bovine Albumin, Dextrose, Catalase*) Ácido oleico, albumina
bovina, dextrosa, catalasa
Ohms Ohmio
pb Pares de bases
PCR (*Polymerase chain reaction*) Reacción en cadena de la polimerasa
pH Potencial de hidrógeno
PZA Pirazinamida
qPCR Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cualitativa
REMA (*Resazurin microtiter assay*) Ensayo de reducción de resazurina
RD1 (*Region of difference 1*) Región de diferenciación 1
RIF Rifampicina
RNA (*Ribonucleic acid*) Ácido ribonucleico
rpm Revoluciones por minuto
RR Resistente a Rifampicina
RT Retrotranscriptasa
s Segundo
SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Taq Thermus aquaticus
TB Tuberculosis
TBST (*Tris buffered saline with Tween-20*) Buffer Tris, NaCl y Tween 20
U/ μ L Unidades por microlitro
UFC/mL Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
XFR (*Extensively drug resistant*) Resistencia extendida
Zur Regulador de absorción de zinc

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la primera causa debido a un agente infeccioso, estimándose que el 23% de la población tiene TB latente. En el 2017 se estimaron 10.0 millones de casos nuevos y 1.3 millones de defunciones. La forma más común de esta enfermedad es la TB pulmonar y su principal agente etiológico es la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), la cual, en el caso de TB pulmonar, es transmitida a través de la inhalación de microgotas en aerosoles que contienen al bacilo viable. El tratamiento consta de la administración de los fármacos de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB), con una duración de seis meses. Sin embargo, la TB farmacorresistente es una amenaza persistente, ya que en el 2017 se estimaron 558,000 casos nuevos de TB resistente a rifampicina (TB-RR), de los cuales el 82% son TB multifarmacorresistente (TB-MFR), por lo que se ha hecho necesario el uso de fármacos de segunda línea, no obstante, el tratamiento es más tóxico, costoso y prolongado. La resistencia en *M. tuberculosis* se ha asociado a mecanismos intrínsecos de la bacteria y a mutaciones en genes específicos, sin embargo, esta condición no se cumple en todos los casos, sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados en este fenómeno. Debido a esto, en investigaciones previas, nuestro equipo de trabajo comparó el perfil de expresión genética entre un aislado clínico MFR (CIBIN:UMF:15:99) y una cepa sensible (H37Rv) de *M. tuberculosis*, y se observó una sobreexpresión de los genes *esxG* y *esxH* en el aislado clínico MFR; estos genes codifican para el complejo EsxG·EsxH, que funciona como regulador de la secreción de proteínas y a su vez es secretado por el sistema ESX-3. Con la finalidad de evaluar si la expresión diferencial de estos genes se encuentra vinculada con la farmacorresistencia en *M. tuberculosis*, en el proyecto se evaluó el efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis*, encontrando que dicha sobreexpresión no modifica las concentraciones mínimas inhibitorias de los fármacos RIF, INH y EMB, por lo que será importante dilucidar la interacción del complejo EsxG·EsxH con otras proteínas codificadas tanto fuera como dentro del locus *esx-3* de la micobacteria, así como con proteínas de la célula hospedadora.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the top 10 causes of death, and the leading cause from a single infectious agent, and about 23% of the world's population are estimated to have a latent TB infection. In 2017, there were an estimated 10.0 million new cases and 1.3 million TB deaths. It typically affects the lungs (pulmonary TB). TB is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* which is spread when people who are sick with pulmonary TB expel bacteria into the air, for example by coughing. The current recommended treatment for cases of drug-susceptible TB is a 6-month regimen of four first-line drugs: isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide. Nevertheless drug-resistant TB is a persistent threat, globally in 2017, there were an estimated 558,000 new cases of rifampicin resistant TB (RR-TB), among which, an estimated 82% had multidrug-resistant TB (MDR-TB). RR/MDR-TB treatment is prolonged, and requires more expensive and more toxic drugs, referred to as second-line drugs. Studies in clinical isolates have vinculated the drug-resistance with mutations in target genes; however, this condition is not met in all cases, suggesting that other mechanisms are involved in this phenomenon. Therefore, during a previous investigation, in order to identify specific genes related to resistance in *M. tuberculosis*, our team compared the gene expression profiles between the pansensitive H37Rv strain and a clinical (CIBIN:UMF:15:99) MDR isolate of *M. tuberculosis*, and an overexpression of *esxG* and *esxH* genes in the MDR clinical isolate was observed. These genes encode for the EsxG·EsxH complex, which functions as a regulator of protein secretion and in turn is secreted by the ESX-3 system. In order to evaluate whether the differential expression of these genes is linked to drug-resistance in *M. tuberculosis*, this investigation evaluated the effect of overexpression of the EsxG·EsxH complex on resistance to first-line drugs in *M. smegmatis*, nevertheless this overexpression did not modify the minimum inhibitory concentrations of the drugs RIF, INH and EMB. Therefore it will be important to elucidate the interaction of the EsxG·EsxH complex with other proteins encoded inside and outside of the locus *esx-3* of the mycobacterium, as well as with the proteins of the host cell.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y la primera causa debido a un agente infeccioso, así mismo, se estima que el 23% de la población tiene TB latente. En 2017 se estimaron 10.0 millones de casos nuevos y 1.3 millones de defunciones a causa de esta enfermedad (OMS, 2018). En México, en el 2017, se reportaron 16,204 casos de TB pulmonar y hasta la semana 46 del 2018, se han presentado 15,393 casos, siendo el estado de Nuevo León el tercer lugar de incidencia con 1,060 casos (SINAVE, 2018).

El principal agente etiológico de la TB es la bacteria bacilar *M. tuberculosis*, que es considerado un patógeno intracelular obligado, aerobio estricto, ácido alcohol resistente (Murray *et al.*, 2013). La enfermedad es transmitida de persona a persona a través de la inhalación de microgotas en aerosoles que contienen al bacilo, que son generados por pacientes infectados al toser, estornudar o hablar (Lozano, 2002). Los principales signos y síntomas de la TB activa son inespecíficos, el paciente puede presentar fiebre, sudores nocturnos, adelgazamiento, anorexia, malestar general y debilidad. En el 90% de los casos surge tos que puede estar acompañada de esputo purulento con sangre (OMS, 2017).

La TB es una enfermedad curable y prevenible, el tratamiento actualmente recomendado consta de la administración de fármacos de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA), con una duración de seis meses (NOM-006-SSA2-2013). Sin embargo, el uso inapropiado de los fármacos y/o la interrupción prematura del tratamiento pueden generar farmacorresistencia en el agente causal (Nguyen, 2016). Las personas infectadas con una cepa de *M. tuberculosis* resistente a uno de los fármacos de primera línea, tienen TB monorresistente, por ejemplo, resistencia a rifampicina (TB-RR) y las personas infectadas con una cepa que es resistente al menos a INH y RIF tienen TB multifarmacorresistente (TB-MFR; OMS, 2018).

Para eliminar al bacilo resistente a los fármacos de primera línea es necesario el uso de fármacos de segunda línea los cuales son más costosos y tóxicos, y el tratamiento tiene una duración de 9 a 12 meses, sin embargo, también pueden surgir cepas con resistencia

extendida (XFR), las cuales son resistentes a al menos una fluoroquinolona y a un agente inyectable de segunda línea, aunado a la MFR (OMS, 2018).

El número de personas infectadas con cepas resistentes sigue en aumento, tan solo en el 2017 se estimaron 558,000 casos de TB-RR de los cuales el 82% (aproximadamente 460,000) eran TB-MFR y hubieron alrededor de 230,000 defunciones debido a TB-RR/MFR en todo el mundo (OMS, 2018). En México, el número de casos acumulados de TB resistente es de 1,082 desde el año 2000 hasta octubre del 2014 (CENAPRECE, 2014).

La resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* se asocia a mutaciones en genes específicos, sin embargo, esta condición no se cumple en todos los casos, sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados en este fenómeno (Shi *et al.*, 2011; Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013; Yamchi *et al.*, 2015).

En investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo, se evaluó el perfil de expresión genética de *M. tuberculosis* entre una cepa sensible (H37Rv) y un aislado clínico multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99), con el objetivo de identificar nuevos marcadores genéticos involucrados con la resistencia a fármacos. En los resultados obtenidos se observó que los genes *esxG* y *esxH* se encontraban diferencialmente expresados entre las dos cepas mencionadas, sugiriendo su potencial vinculación en la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013). Así mismo, se evaluó la expresión de dichos genes en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* que presentaban diferentes perfiles de resistencia a fármacos, encontrándose que en algunas de las cepas analizadas los genes *esxG* y *esxH* mostraban una tendencia de sobreexpresión en comparación con la cepa sensible H37Rv (González-Escalante *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, en el presente proyecto fue de interés conocer el efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG-EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en un modelo experimental de *M. tuberculosis*, con el fin de identificar nuevos marcadores que apoyen a la detección temprana de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos, permitiendo el establecimiento de un esquema terapéutico oportuno para los pacientes con tuberculosis.

2. ANTECEDENTES:

2.1 Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa causada principalmente por la bacteria *M. tuberculosis*, la cual ha existido por milenios y sigue siendo uno de los principales problemas de salud. Esta bacteria causa la enfermedad en millones de personas cada año, siendo en el 2017 la novena causa de muerte a nivel mundial y la principal causa debido a un agente infeccioso (OMS, 2018).

El contagio se produce principalmente por vía aérea de persona a persona, a partir de pacientes infectados con lesiones pulmonares que, al toser, estornudar o hablar generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas (microgotas) que contienen de uno a tres bacilos. Las microgotas de 1-5 μm , son transportadas hacia las vías respiratorias inferiores, hasta llegar a los alvéolos, teniendo la capacidad de desencadenar la infección primaria (Edwards y Kirkpatrick, 1986). La dosis infectiva estimada es de 10 bacilos de *M. tuberculosis* por inhalación (OMS, 2013).

Una vez en los alveolos, los bacilos son capaces de infectar principalmente macrófagos alveolares (Smith, 2003), los cuales internalizan a la bacteria por fagocitosis (Longo *et al.*, 2012), posteriormente el bacilo bloquea la fusión fagosoma-lisosoma, al inhibir al antígeno endosomal específico 1 (EEA1), y puede evitar su destrucción al: 1) producir intermediarios reactivos del nitrógeno (Murray *et al.*, 2013) y 2) evitar la acidificación y maduración del fagosoma (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Por otro lado, a través de sistema de secreción ESX-1, *M. tuberculosis* genera la ruptura de la membrana fagosomal, facilitando la liberación de los productos de la bacteria al citoplasma del macrófago (Houben *et al.*, 2012), estas condiciones le permiten al patógeno crecer y asegurar su supervivencia intracelularmente.

Una vez en el parénquima pulmonar y en respuesta a la infección, los macrófagos secretan citocinas, como interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), para reclutar linfocitos T (LcT) y células Natural Killer (NK) y promover la diferenciación de Lc Th1 (colaboradores) hacia las zonas de infección, aumentando con ello la inflamación localizada y la secreción de interferón gamma (IFN- γ). Esto conlleva a la activación de los macrófagos infectados, aumentando la fusión fagosoma-lisosoma y la destrucción del

bacilo intracelular. Sin embargo, cuando las células del sistema inmune son incapaces de eliminar con éxito al bacilo, se produce una TB primaria o bien se genera la formación de un granuloma (Murray *et al.*, 2013).

Después de la exposición al bacilo, aproximadamente 10-20% de las personas logran eliminar al bacilo mediante la respuesta inmune, por lo tanto, nunca desarrollan la enfermedad. Sin embargo, del 80-90% de las personas infectadas, el 5% desarrollan una TB pulmonar primaria (Figura 1; Abel *et al.*, 2014), la cual es común en niños y en personas inmunocomprometidas, con un curso agudo y con frecuencia asociada a la enfermedad extrapulmonar debido a la diseminación del bacilo en el torrente sanguíneo (Cruz y Starke, 2007). La TB extrapulmonar se presenta con mayor frecuencia en ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos, articulaciones, meninges, peritoneo y pericardio; sin embargo, todos los órganos y aparatos pueden resultar afectados (Longo *et al.*, 2012).

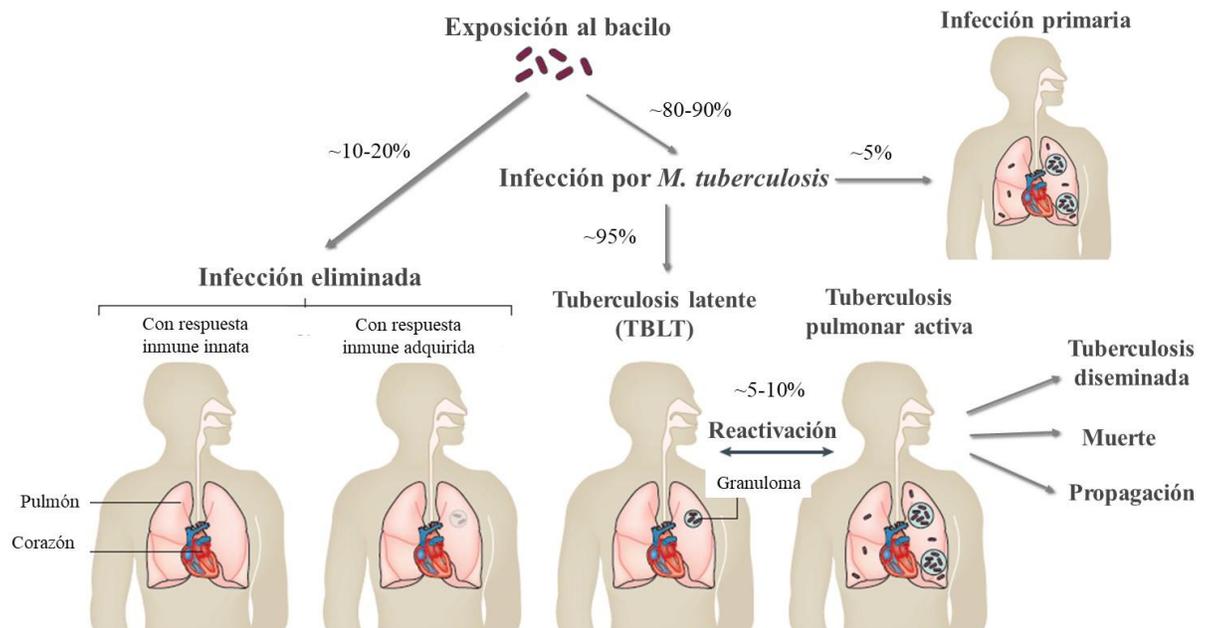


Figura 1. Infección y desarrollo de la TB clínica causada por *M. tuberculosis*. Modificado de Pai *et al.*, 2016 y Abel *et al.*, 2014.

La TB pulmonar primaria puede ser asintomática o tener en sus inicios fiebre y en ocasiones dolor pleurítico. Después de la infección inicial (foco de Ghon), generalmente aparece una lesión periférica que conlleva a adenopatías hiliares debido a la propagación del bacilo del parénquima pulmonar a los ganglios linfáticos. En la mayor parte de los

casos la lesión se cura de manera espontánea y se puede observar solo en forma de un pequeño nódulo calcificado (Longo *et al.*, 2012).

El resto de las personas infectadas (~95%) desarrollan una TB latente (TB-LT), que generalmente es asintomática (Figura 1; Abel *et al.*, 2014). Se estima que el 23% del total de la población se encuentra en esta etapa de la infección (OMS, 2018), en la cual se genera una estructura llamada granuloma o tubérculo con el fin de impedir la diseminación posterior de las bacterias y evitar su reproducción, ya que el bacilo puede sobrevivir dentro del granuloma, pero su crecimiento se inhibe en el interior del entorno necrótico por la baja tensión de oxígeno y el pH ácido (Figura 2). En este punto algunas lesiones pueden cicatrizar por fibrosis, con calcificación subsiguiente, y en otras lesiones puede ocurrir inflamación y necrosis (Longo *et al.*, 2012).

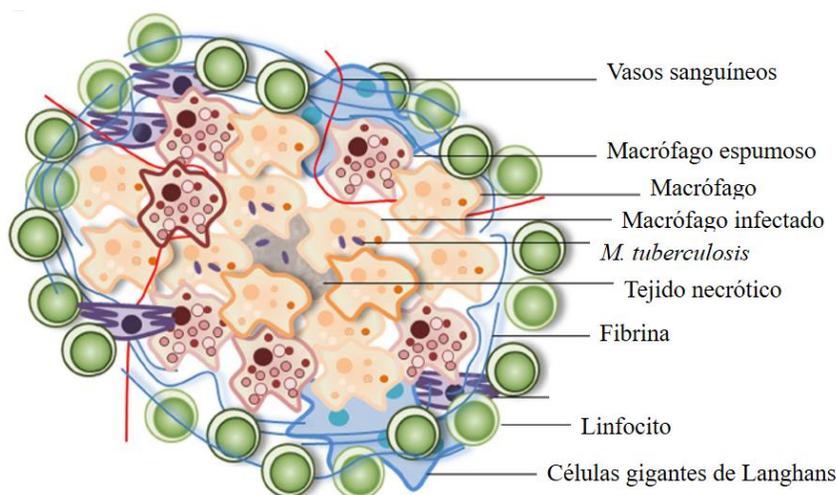


Figura 2. Esquema de los componentes celulares del granuloma. Adaptado de Guirado y Schlesinger, 2013.

M. tuberculosis puede persistir por décadas dentro del granuloma, sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos (con infección por VIH, diabetes, cáncer, malnutrición, envejecimiento o tratamientos con inmunosupresores) y/o debido a factores genéticos, la bacteria se puede reactivar generando TB secundaria (infección post-primaria) que da lugar a una TB activa, que conducirá a la progresión del granuloma y a la enfermedad (Guirado y Schlesinger, 2013). Del total de personas con TB-LT, aproximadamente 5-10% presentan una reactivación durante su vida (Figura 1; Abel *et al.*, 2014). La acumulación caseosa en el centro del granuloma promueve un incremento del tejido

necrótico, con el consecuente colapso del granuloma el cual libera bacilos virulentos a otras partes del tejido, donde más lesiones se formarán (Longo *et al.*, 2012).

La ruptura de los granulomas en las vías aéreas puede permitir la transmisión de la bacteria a otros individuos (Guirado y Schlesinger, 2013). Se estima que las personas con TB activa pueden infectar de 10-15 personas durante el curso de un año (OMS, 2010). En las primeras fases de la TB secundaria las manifestaciones clínicas son inespecíficas, el paciente puede presentar fiebre, sudores nocturnos, adelgazamiento, anorexia, malestar general y debilidad. En el 90% de los casos surge tos que puede estar acompañada de esputo purulento con sangre (OMS, 2017).

El diagnóstico clínico se apoya principalmente en: indicios radiológicos de enfermedad pulmonar, resultados positivos en la prueba de reactividad cutánea, y mediante la detección en el laboratorio de micobacterias al microscopio o en cultivo (Murray *et al.*, 2013).

2.2 Mycobacterium tuberculosis

La TB es causada por el complejo *M. tuberculosis* (MTC), el cual está conformado por diez especies genéticamente relacionadas, sin embargo dentro de las de importancia clínica en humanos se incluyen: *M. tuberculosis* (principal agente etiológico de la enfermedad), *M. africanum*, *M. canettii* (ambos pueden causar TB en humanos), *M. bovis* (afecta a humanos, bovinos domésticos y salvajes y cabras; Cousins *et al.*, 2003) y *M. orygis* (patógeno de humanos y animales en África y Asia del Sur; van Ingen *et al.*, 2012).

Las bacterias del género *Mycobacterium* pertenecen a la familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales y clase Actinomycetes (Lehmann y Neumann, 1896). Son bacilos ácido-alcohol resistentes, aerobios, inmóviles, no esporulados, con un tamaño de 0.2 a 0.6 μm de diámetro y 1 a 10 μm de longitud (Figura 3A; Murray *et al.*, 2013).

En cuanto a su morfología macroscópica, se puede observar colonias rugosas, densas y compactas de color crema o beige en medio Lowenstein-Jensen (Figura 3B y 3C; Madigan *et al.*, 2009; Velayati y Farnia, 2017).

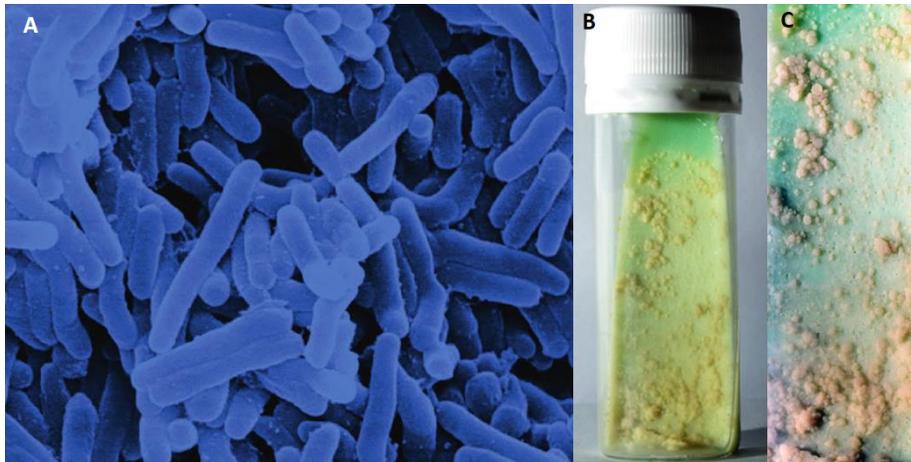


Figura 3. Morfología microscópica y macroscópica de *M. tuberculosis*. A) Bacilos observados con microscopio electrónico de transmisión. B) y C) Colonias color crema con apariencia compacta y rugosas de *M. tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen. Adaptado de Velayati y Farnia, 2017.

Su pared celular está compuesta de una membrana citoplásmica interna cubierta de peptidoglucano y una membrana externa conocida como micomembrana. En la membrana interna se anclan proteínas como el lipoarabinomano (LAM). A la capa de peptidoglucano se unen los arabinogalactanos y los ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se anclan glucolípidos. Los lípidos representan el 60% del peso de la pared celular y las proteínas transportadoras y porinas constituyen el 15% del peso de esta (Figura 4; Murray *et al.*, 2013). Así mismo, posee un glucolípido característico en la superficie celular, conocido como “factor cuerda” que genera la formación de estructuras largas en forma de cordón en medio sólido y líquido debido a la agregación de largas cadenas de bacterias (Figura 4; Madigan *et al.*, 2009).

Debido a que la pared celular de las micobacterias es compleja y que se consideran microorganismos nutricionalmente exigentes, la mayoría crecen lentamente, se dividen cada 20 a 24 horas y se necesitan aproximadamente 25 días antes de poder detectar el crecimiento en el medio Lowenstein-Jensen (Murray *et al.*, 2013; Pfyffer y Wittwer, 2012).

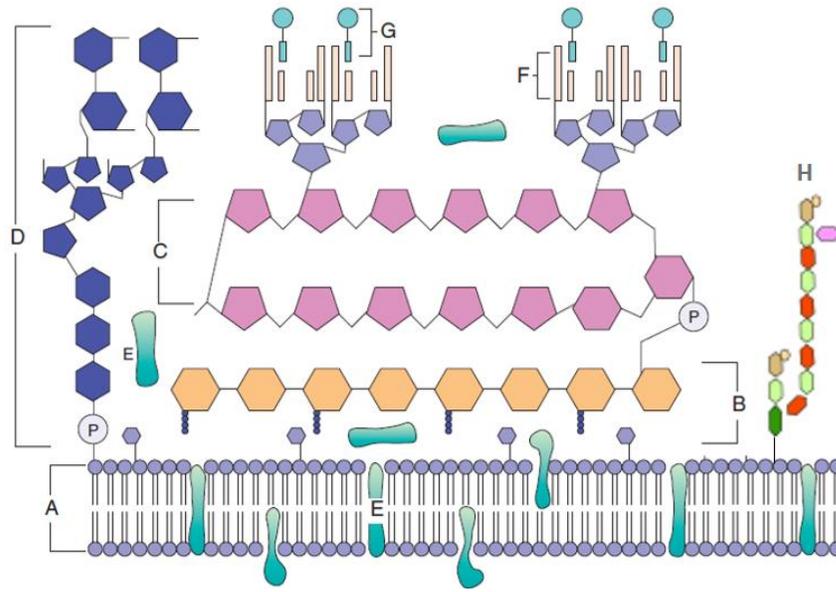


Figura 4. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*. Consta de (A) membrana plasmática, (B) peptidoglucano, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomano, (E) proteínas asociadas a la membrana plasmática y a la pared celular, (F) ácidos micólicos, (G) glucolípidos (H) factor cuerda. Modificado de Murray *et al.*, 2013.

La permeabilidad de las micobacterias a sustancias de su medio ambiente está controlada por las propiedades de su envoltura. La capa de ácidos micólicos, actúa como una barrera eficiente que puede ser la principal característica intrínseca de resistencia de las micobacterias a los antibióticos más comunes, agentes terapéuticos y desinfectantes químicos (Velayati y Farnia, 2017), así como a las tinciones convencionales, su acido-alcohol resistencia y respuesta inmunitaria del hospedador: antigenicidad (Murray *et al.*, 2013).

Las micobacterias no se tiñen fácilmente con la tinción de Gram debido al alto contenido lipídico en su superficie, por lo tanto, para su identificación se utiliza la tinción acido alcohol resistente, conocida como tinción de Ziehl-Neelsen (Madigan *et al.*, 2009).

2.3 Epidemiología

En el 2017, se estimaron 10.0 millones de casos nuevos de TB en todo el mundo, de los cuales 90% fueron adultos y 9% personas con VIH positivo. Los cinco países con mayor número de casos en el 2017 fueron (en orden descendente): India, China, Indonesia, las Filipinas y Pakistán, que representaron el 55% del total de casos y tan sólo los primeros

tres representaron el 36%. La TB extrapulmonar representó el 14% de los 6.4 millones de casos notificados en ese año (OMS, 2018).

Así mismo, hubo 1.3 millones de defunciones a causa de la TB y adicionalmente 300,000 entre personas con VIH positivo. A pesar de que el número de muertes por TB disminuyó un 29% entre el 2000 y el 2017, sigue siendo una de las 10 causas de muerte en el mundo (Figura 5; OMS, 2018).

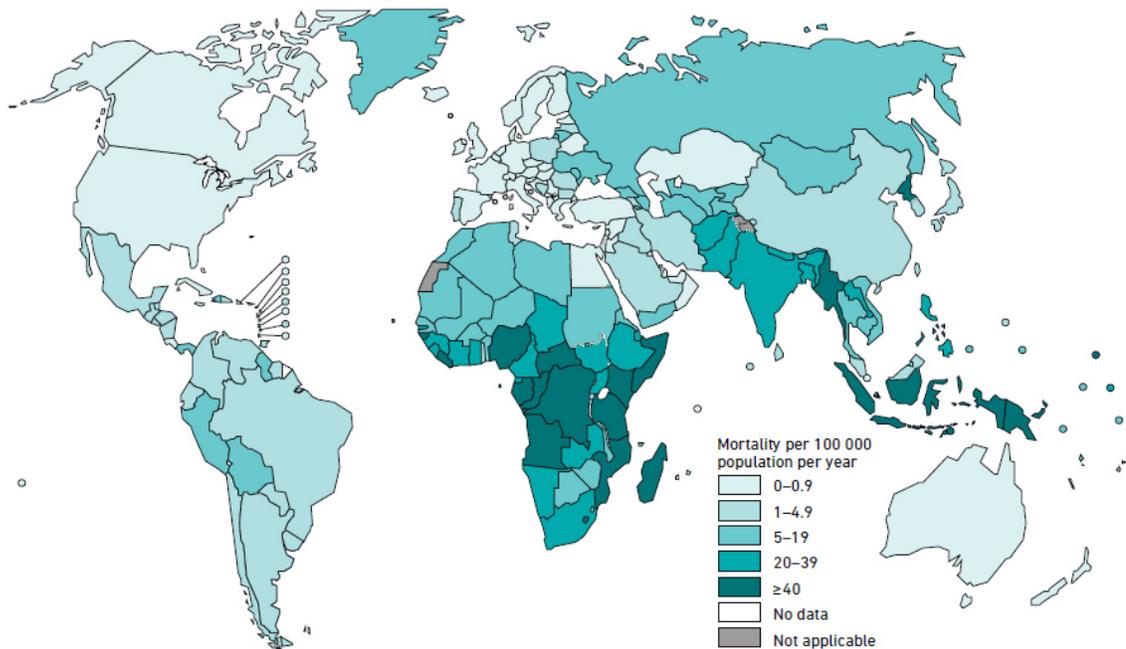


Figura 5. Tasas de mortalidad estimadas por tuberculosis, excluyendo las muertes por tuberculosis en personas con VIH en el 2017 (OMS, 2018).

Con respecto a México, en el 2017, se reportaron 16,204 casos de TB pulmonar. Los primeros 3 estados que presentaron la mayor incidencia fueron: Veracruz, Baja California y Nuevo León con 1,968, 1,674 y 1,107 casos reportados respectivamente. Hasta la semana 46 del 2018, se han presentado 15,393 casos de TB pulmonar, en donde los tres estados mencionados anteriormente siguen siendo los primeros lugares en incidencia con 1,810, 1,552 y 1,060 casos respectivamente (SINAVE, 2018).

En México, durante el 2015, se estimaron 2,125 casos de defunciones por TB de los cuales 1,665 (~78%) fueron causados por TB pulmonar. Nuevo León ocupa el tercer lugar de muertes debido a esta enfermedad, únicamente por debajo de Veracruz y Baja California

con 182 casos, de los cuales 162 (~89%) fueron a causa de TB pulmonar (CENAPRECE, 2017).

Por lo tanto, es importante que se realice un diagnóstico oportuno y preciso de la TB seguido de la administración del tratamiento indicado por las normas internacionales, con el objetivo de prevenir muertes y evitar la transmisión de la enfermedad (OMS, 2017).

2.4 Tratamiento

La tasa de éxito del tratamiento es alrededor del 85%, la mayoría de los casos se pueden curar cuando los antibióticos se administran de manera apropiada. Entre el 2000 y 2017, se estimó que se evitaron 54 millones de muertes (OMS, 2018).

Las pacientes con TB-LT no presentan síntomas y no pueden propagar el bacilo a otras personas, sin embargo, se puede generar una TB activa (TB secundaria). Por esta razón es necesario que se prescriba tratamiento siendo INH el fármaco prescrito en México (NOM-006-SSA2-2013).

El tratamiento actual recomendado por la OMS para los nuevos casos de TB susceptible a antibióticos consta de la administración de fármacos de primera línea INH, RIF, EMB y PZA y en ocasiones estreptomocina (STR). Para estos pacientes el tratamiento consta de dos fases: 1) Fase intensiva que incluye: INH, RIF, EMB y PZA, durante 2 meses y 2) Fase de sostén que incluye INH y RIF, durante 4 meses (OMS, 2010).

Cuando un paciente abandona el tratamiento o recae a un tratamiento primario acortado, se sugiere un retratamiento primario el cual incluye 3 fases, con diferentes fármacos. Estas fases son similares indicadas por la NOM-006-SSA2-2013 y la OMS (Tabla 1).

Tabla 1. Indicaciones de retratamiento para pacientes con TB activa.

	Fases			Duración total
	Intensiva	Intermedia	Sostén	
Fármaco	INH, RIF, PZA, EMB, STR	INH, RIF, PZA, EMB	INH, RIF, EMB	8 meses
Duración	2 meses	1 mes	5 meses	

(OMS, 2010)

2.5 Fármacos de primera línea

La isoniazida, es uno de los fármacos antituberculosos más efectivos y específicos, el cual, solo es activo contra bacilos metabólicamente activos (Bardou *et al.*, 1998) y también es considerado un bactericida intra y extracelular (NOM-006-SSA2-2013). Se ha descrito que INH interfiere con las síntesis de ácidos micólicos de la pared celular con el siguiente mecanismo de acción: una vez que el fármaco entra a la célula micobacteriana por difusión pasiva, es convertido a su forma activa por la proteína KatG (enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG*), se une a NAD, formando un aducto INH-NAD, que juntos inhiben a la proteína InhA (Johnssons y Schultz 1995), la cual es una proteína reductasa (codificada por el gen *inhA*), que se ha visto involucrada en la biosíntesis de ácidos micólicos de la pared celular (Dessen *et al.*, 1995).

La rifampicina, se caracteriza por tener una excelente actividad esterilizante y bactericida (NOM-006-SSA2-2013) ya que es capaz de difundirse libremente dentro de los tejidos, células vivas y bacterias, haciéndola extremadamente efectiva en contra de los patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* (Campbell *et al.*, 2001), así mismo, es activo en contra de bacilos en replicación y bacilos en estado dormante (Mitchison, 1979; Jnawali y Ryoo, 2013). Su mecanismo de acción es inhibir la transcripción del DNA al unirse a la subunidad β de la RNA polimerasa (codificada por el gen *rpoB*) (Ramaswamy y Musser, 1998), inhibiendo su actividad y por lo tanto el microorganismo muere.

El etambutol, es un agente bacteriostático extra e intracelular, que es activo contra los bacilos en replicación que son metabólicamente activos (NOM-006-SSA2-2013). EMB interfiere con la biosíntesis del arabinogalactano de la pared celular. La enzima arabinosil transferasa, codificada por el gen *embB*, es una de las enzimas involucradas en la síntesis de arabinogalactano, la cual se ha propuesto como el blanco del fármaco EMB en *M. tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1997).

La pirazinamida se caracteriza por su capacidad bactericida intracelular de los bacilos semilantes en ambientes ácidos (NOM-006-SSA2-2013). Es un análogo estructural de la nicotinamida, que es capaz de entrar a la bacteria por difusión pasiva y requiere ser convertido a su forma activa conocida como ácido pirazinoico (POA), por la enzima citoplasmática pirazinamidasa/nicotinamidasa (PZasa) codificada por el gen *pncA* (Konno

et al., 1967). Luego el POA sale de la célula por difusión pasiva, y si el ambiente extracelular es ácido (pH 5.5), una pequeña porción del POA se convertirá en un ácido protonado sin carga (HPOA), el cual penetra fácilmente por la membrana, causando su acumulación y eventualmente induce la acidificación del citoplasma, lo que genera la inhibición de enzimas vitales para la bacteria. Así mismo, POA puede interrumpir la energía de la membrana al inhibir la fuerza protón motriz, afectando el transporte de la membrana, inhibiendo proteínas y síntesis de RNA (Zhang *et al.*, 2013).

2.6 Fármacos de segunda línea

La OMS propone un tratamiento para aquellas personas con TB-MFR, sin embargo, este tratamiento es más prolongado y requiere de fármacos más costosos y tóxicos que son conocidos como fármacos de segunda línea (Tabla 2). Hasta el 2016, el régimen recomendado por la OMS tenía una duración de 20 meses, no obstante, en ese mismo año, recomendó un tratamiento acortado de 9-12 meses para todos los pacientes que no son resistentes a fármacos de segunda línea (OMS, 2017).

Tabla 2. Fármacos antituberculosos de segunda línea clasificados por grupos

Grupos	Grupo de medicamentos	Medicamento (abreviatura)
Grupo 1	Fármacos orales de primera línea, útiles en el tratamiento de TB-MFR	Etambutol (EMB), Pirazinamida (PZA)
Grupo 2	Fármacos inyectables	Kanamicina (Km), Amikacina (Am), Capreomicina (Cm)
Grupo 3	Fluoroquinolonas	Ofloxacino (Ofx); Levofloxacino (Lfx); Moxifloxacino (Mfx).
Grupo 4	Bacteriostáticos orales de segunda línea.	Etionamida (Eto), Protionamida (Pto), Cicloserina (Cs), Terizidona (Trd), Acido p-aminosalicílico (PAS).
Grupo 5	Fármacos de eficacia poco clara.	Clofazimina (Cfz), Amoxicilina/Clavulanato (Amx/Clv), Claritromicina (Clr), Linezolid (Lzd), Tioacetazona (Th), Imipenem/Cilastatín (Ipm/Cln), dosis altas de isoniazida, Claritromicina (Clr)

(NOM-006-SSA2-2013)

2.7 Farmacorresistencia

El tratamiento de la TB ha sido un reto terapéutico, no solo por la alta resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* a los antibióticos, sino también por las nuevas mutaciones adquiridas que le confieren más resistencia (Nguyen, 2016). Así mismo, el uso inapropiado o incorrecto de los antimicrobianos, el uso de formulaciones ineficaces (como la toma de un único fármaco, la mala calidad de los medicamentos o las malas condiciones de almacenamiento) y la interrupción prematura del tratamiento pueden ser causa de farmacorresistencia (OMS, 2017).

La OMS define a la TB monorresistente como aquella que es resistente a uno de los fármacos de primera línea, siendo la TB resistente a RIF (TB-RR) una de las más comunes; la TB multifarmacorresistente (TB-MFR) es aquella que tiene resistencia al menos a INH y RIF los cuales son los fármacos más importantes en el tratamiento de la TB; por último, la TB con resistencia extendida (TB-XFR) es definida como aquella con resistencia a al menos una fluoroquinolona y a un agente inyectable de segunda línea aunado a la multifarmacorresistencia (OMS, 2018).

En el 2017 se estimaron 558,000 casos nuevos de RR-TB, de los cuales el 82% son TB-MFR, siendo India, China, y la Federación Rusa los países que representaron el 47% de estos casos (Figura 6) así mismo, se estimaron 230,000 de defunciones debido a TB-RR/MFR (OMS, 2018).

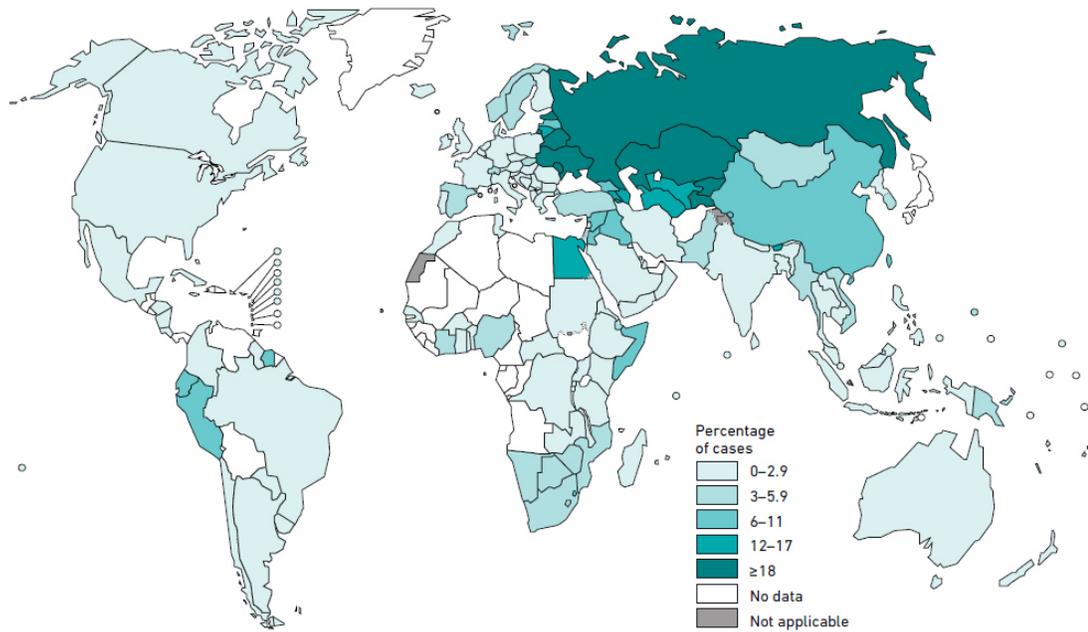


Figura 6. Porcentaje de casos nuevos de TB RR/MFR en el 2017 (OMS, 2018).

Respecto a México, el número de personas con TB resistente ha ido en aumento, reportándose un total de 1,082 casos desde el año 2000 hasta octubre del 2014 (CENAPRECE, 2014).

Según la guía emitida por la OMS en mayo del 2016, todos los casos de TB-RR y TB-MFR, deben ser tratados con fármacos de segunda línea, por lo que la combinación PZA más fluoroquinolonas de cuarta generación (moxifloxacino o gatiloxacino) es considerado esencial para el tratamiento (OMS, 2017).

La resistencia intrínseca de *M. tuberculosis*, le proporciona un alto nivel de resistencia a los fármacos, que no solo limita el uso de antibióticos existentes, si no, también hace más difícil el desarrollo de nuevos fármacos. En *M. tuberculosis* no se ha reportado resistencia debido a la transferencia horizontal de genes, sin embargo, su resistencia es debida principalmente a mutaciones del cromosoma debido al uso selectivo de ciertos antibióticos (Nguyen, 2016). Algunos de los genes de *M. tuberculosis* involucrados en la resistencia a fármacos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Mutaciones de los genes relacionados con resistencia en *M. tuberculosis*.

Fármaco afectado	Mecanismo de acción	Gen	Proteína codificada	Función de la proteína
INH	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos y otros procesos metabólicos.	<i>katG</i>	Catalasa/peroxidasa	Activación de INH
		<i>inhA</i>	Reductasa	Síntesis de peptidoglicano
		<i>ndh</i>	NADH deshidrogenasa	Modula relación de NADH/NAD
RIF	Inhibe transcripción	<i>rpoB</i>	Subunidad β de la RNA polimerasa	Replicación
EMB	Inhibe síntesis de arabinogalactano	<i>embB</i>	Arabinosiltransferasa	Síntesis de arabinogalactano
PZA	Interrumpe la síntesis de energía en la membrana citoplasmática	<i>pncA</i>	Pirazinamidasa/nicotinamidasa	Activación de PZA
STR	Inhibe síntesis de proteínas	<i>rpsL</i>	Proteína ribosomal S12	Replicación
		<i>rrs</i>	16S rRNA	Replicación

(Nguyen, 2016)

Los dos principales mecanismos de resistencia a INH están asociados con mutaciones en las regiones codificantes o promotoras de los genes *katG* e *inhA*. La mutación en *katG* disminuye la conversión de INH a su forma activa (Vilchèze y Jacobs, 2007). La mutación en el promotor del gen *inhA* causa una sobreexpresión de la proteína InhA, o menos frecuente, una mutación en su sitio activo, que disminuye su afinidad por el aducto INH-NAD generando resistencia en cualquiera de los dos casos (Rozwarski *et al.*, 1998). Otro mecanismo involucrado es la mutación en el gen *ndh* que codifica para NADH deshidrogenasa, lo que altera la relación NADH/NAD dentro de la célula, dando lugar a inhibición competitiva del aducto INH-NAD (Vilchèze *et al.*, 2005).

Se ha observado que la mayoría de las cepas clínicas de *M. tuberculosis* poseen mutaciones en el gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, generando cambios conformacionales que disminuyen la afinidad de la RIF desarrollando resistencia a dicho fármaco (Telenti *et al.*, 1993). Por otro lado, las mutaciones en el gen

pncA siguen siendo las más comunes en cepas resistentes a PZA, lo que genera una disminución de la transformación del fármaco a su forma activa (Scorpio y Zhang, 1996).

El mecanismo para la resistencia a EMB se ha relacionado a mutaciones en el gen *embB* (Sreevatsan *et al.*, 1997) posiblemente disminuyendo la afinidad del fármaco por la arabinosil transferasa codificada por dicho gen. Por último, mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* son los principales mecanismos de resistencia a la estreptomicina, encontrados en 60-70% de las cepas resistentes (Gillespie, 2002).

Como se mencionó anteriormente, muchos estudios se han enfocado en relacionar la resistencia a fármacos a diferentes mutaciones, tanto en los genes blanco del fármaco (Vilchèze y Jacobs, 2007; Talenti *et al.*, 1993; Sreevatsan *et al.*, 1997), o en genes que codifican para enzimas que modifican el fármaco a su forma activa (Rozwarski *et al.*, 1998; Scorpio y Zhang, 1996), sin embargo, en algunos casos, la identificación de las mutaciones de genes en *M. tuberculosis* no han sido suficiente para identificar su resistencia, sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados (Shi *et al.*, 2011; Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013; Yamchi *et al.*, 2015).

En estudios previos en el laboratorio, se evaluó el perfil de expresión de genes de *M. tuberculosis* en una cepa sensible (H37Rv) y un aislado clínico multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99), con el objetivo de identificar nuevos genes asociados con la sensibilidad o resistencia a fármacos. Se realizó el análisis de la expresión de genes por microarreglos y se identificaron genes diferenciales expresados entre ambas cepas. Estos resultados se confirmaron por PCR cuantitativa (qRT-PCR), observando una sobreexpresión de los genes *esxG*, *esxH*, *rpsA*, *esxI*, y *rpml* y una inhibición de los genes *lipF*, *groES*, y *narG* en la cepa multifarmacorresistente en comparación con la sensible, sugiriendo que estos genes pueden estar potencialmente involucrados en la resistencia a fármacos (Figura 7; Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013).

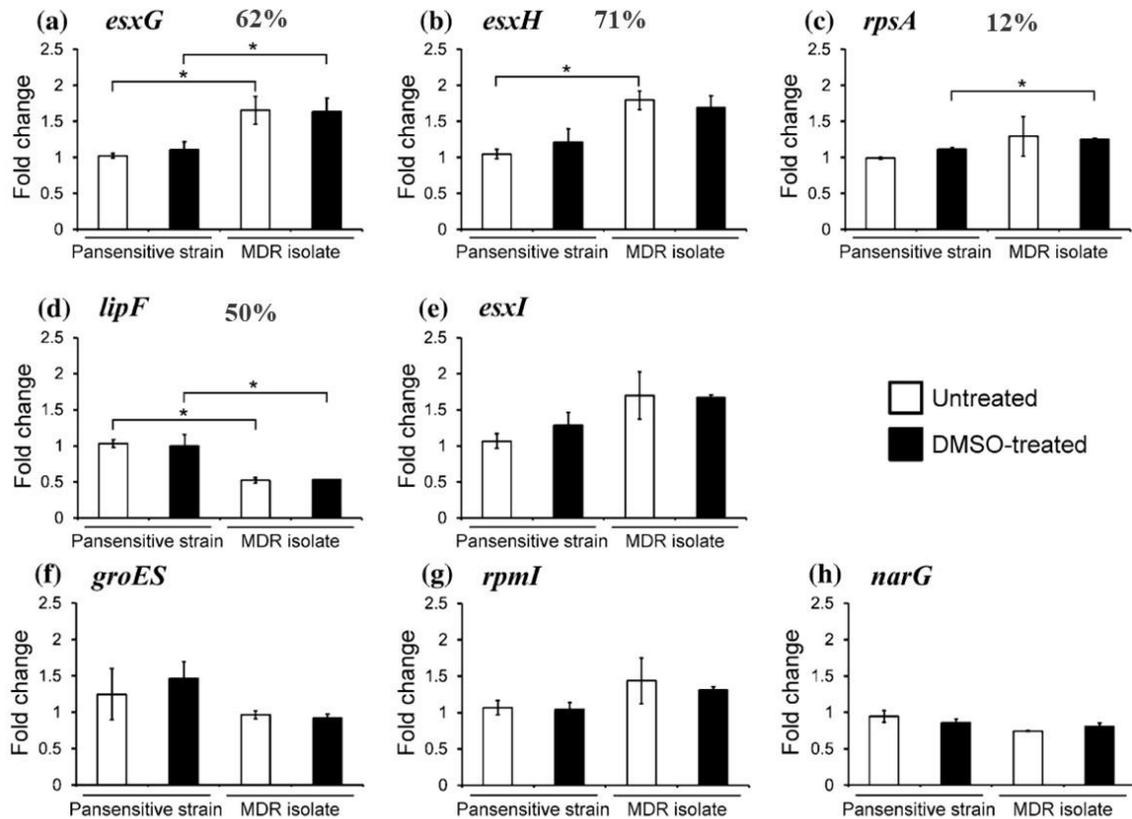


Figura 7. Genes diferencialmente expresados en una cepa sensible (Pansensitive strain) y una multifarmacorresistente (MDR isolate) de *M. tuberculosis* por RT-qPCR. Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013.

Así mismo, se evaluaron los genes que resultaron diferencialmente expresados en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* que presentaban diferentes perfiles de resistencia a fármacos, encontrándose que en algunas de las cepas analizadas los genes *esxG* y *esxH* mostraban una tendencia de sobreexpresión en comparación con la cepa sensible (H37Rv). Aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos estos dos genes presentaron patrones similares de expresión en cada una de las cepas analizadas, infiriendo una posible co-regulación de ambos genes (Figura 8; González-Escalante *et al.*, 2015).

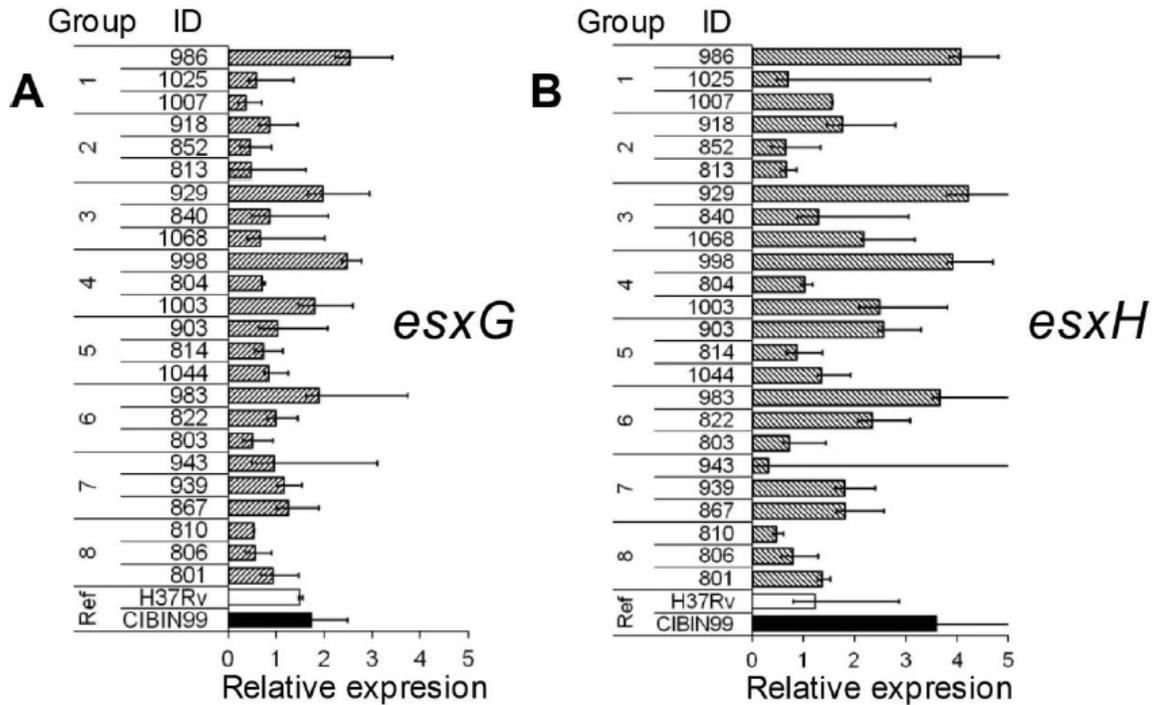


Figura 8. Expresión de los genes *esxG* y *esxH* en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* agrupados según su perfil de resistencia a fármacos, analizados mediante RT- qPCR González-Escalante *et al.*, 2015.

2.8 Sistemas de secreción ESX

Los genes *esxG* y *esxH* se encuentran en un *cluster* denominado *esx-3* que forma parte de los sistemas de secreción conocidos como ESAT6 (ESX o sistema de secreción de tipo VII) en *M. tuberculosis* (Brodin *et al.*, 2004), los cuales funcionan como sistemas de secreción especializados que permiten el transporte de proteínas incluyendo proteínas de la familia Esx (vinculadas a la patogénesis y supervivencia dentro del hospedero) a través de la gruesa pared celular de las micobacterias, que forma una barrera estructural para la exportación de proteínas (Houben *et al.*, 2014).

La identificación del primer sistema de secreción ESX-1, inició con la comparación de los genomas de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* bacilo atenuado Calmette-Guérin (BCG; cepa utilizada en la vacuna para la prevención de la TB). Se encontró que todas las subcepas de *M. bovis* BCG tenían una delección de 9.5 Kb a la cual se le denominó región de diferenciación 1 (RD1), dando lugar a la pérdida de virulencia

y atenuación de dicha cepa (Mahairas *et al.*, 1996). La región RD1 está conformada por 9 genes, incluyendo los genes que codifican para la proteína EsxA conocida como ESAT-6 (antígeno de secreción temprana de 6 kDa, de aquí el nombre de los sistemas de secreción) y la proteína EsxB conocida como CFP-10 (proteína filtrada de cultivo de 10 kDa), las cuales son proteínas secretadas por el mismo sistema (Tekaiia *et al.*, 1999).

En *M. tuberculosis* existen 5 sistemas de secreción ESX descritos (ESX-1, 2, 3, 4 y 5), los cuales poseen características similares importantes, 1) presencia de un par de genes que codifican para proteínas pequeñas (parálogas a EsxA y EsxB) de aproximadamente 100 aminoácidos que forman un heterodímero o complejo 1:1, 2) genes que codifican para componentes básicos (ESX core component, Ecc), los cuales son: EccA (ATPasa), EccB (proteína de membrana), EccC (ATP asa), EccD (proteína transmembrana) EccE (proteína transmembrana) y proteína MycP (proteasa semejante a subtilisina) 3) algunos clusters poseen genes que codifican para proteínas de secreción asociadas (Esp), de las cuales, algunas son específicas del sistema ESX-1, y otras (como EspG) tienen homólogos en otros sistemas ESX y 4) algunos *clusters* poseen genes que codifican para proteínas PE y PPE con motivos Pro-Glu y Pro-Pro-Glu respectivamente (Houben *et al.*, 2014; Gröschel *et al.*, 2016). A pesar de las similitudes, estos sistemas no se complementan y cada uno tiene diferentes funciones en la virulencia y fisiología de *M. tuberculosis*. De estos 5 sistemas al menos 3 son necesarios para la virulencia (Gröschel *et al.*, 2016).

Los genes que codifican el sistema ESX-3 están conservados en diferentes micobacterias (Figura 9), lo que sugiere su importante función en la viabilidad y patogenicidad de las especies micobacterianas patógenas. Se ha identificado que este sistema se requiere para un crecimiento óptimo de *M. tuberculosis* y se ha asociado con el proceso esencial de adquisición de iones hierro que son extraídos del macrófago infectado por los sideróforos micobacterianos lipofílicos parecidos a micobactina (Siegrist *et al.*, 2009). La expresión de estos genes es regulada positivamente bajo condiciones limitadas de hierro y zinc; y son transcritos a partir de dos promotores regulados por 3 factores de transcripción: 1) el represor transcripcional dependiente de hierro (IdeR), 2) el regulador de absorción de zinc

(Zur) y 3) el regulador de transporte de manganeso (MntR) (Rodríguez *et al.*, 2002; Maciag *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2015).

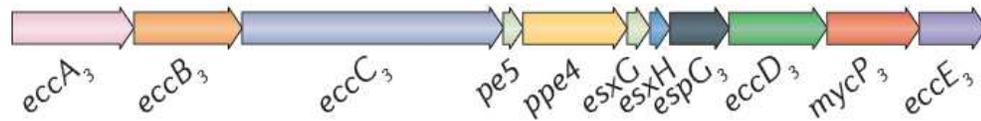


Figura 9. Organización de los genes que componen el locus del sistema ESX-3. Adaptado de Gröschel *et al.*, 2016.

2.9 Características y funciones de los genes *esxG* y *esxH* de *M. tuberculosis*

El gen *esxG* (Rv0287 o TB9.8) consta de 294 pb y codifica para la proteína EsxG de 97 aminoácidos, con una masa molecular de ~9.777 kDa y un punto isoeléctrico de 6.5051. El gen *esxH* (Rv0288 o TB10.4) consta de 291 pb y codifica para la proteína EsxH de 96 aminoácidos, con una masa molecular de ~10.39 kDa y un punto isoeléctrico de 4.3451 (Lew *et al.*, 2011). EsxG y EsxH forman parte de las 23 proteínas de la familia Esx, denominadas de la A a la W en *M. tuberculosis*, que se caracterizan por su tamaño pequeño (~100 aminoácidos), la presencia de un motivo central WXG (proteínas WXG100) y su organización en pares dentro del genoma (Pallen, 2002). EsxG y EsxH son parálogas a las proteínas EsxB (CFP-10) y EsxA (ESAT-6), respectivamente (Uplekar *et al.*, 2011).

Las proteínas EsxG y EsxH son secretadas por el sistema ESX-3 como un heterodímero 1:1, el cual es reconocido por la proteína EccC, una ATPasa que se activa y provee la energía necesaria para co-transportarlas a través de la proteína EccD que forma el canal exportador (Kunnath-Velayudhan y Porcelli, 2013).

Se ha demostrado que las proteínas EsxG y EsxH son requeridas para el metabolismo y captación del hierro, sin embargo, se ha sugerido que su función es indirecta, ya que promueve la secreción del heterodímero PE5-PPE4, las cuales están codificadas dentro del locus *esx-3*, y se ha demostrado que tienen un papel esencial en la adquisición de hierro mediado por sideróforos. Así mismo, las proteínas EsxG y EsxH promueven la secreción de otras proteínas pertenecientes a la familia PE-PPE, las cuales son PE15-PPE20 codificadas fuera del locus *esx-3*, este mecanismo de secreción es independiente de hierro, por lo tanto, se sugiere que el heterodímero EsxG:EsxH es un regulador general de la

secreción, en lugar de un regulador específico del metabolismo del hierro (Tufariello *et al.*, 2016).

También se ha identificado que EsxG y EsxH deterioran la maduración del fagosoma e interrumpen al complejo de clasificación endosomal del huésped requerido para el transporte (ESCRT) el cual entrega a *M. tuberculosis* a los lisosomas y restringe el crecimiento bacteriano intracelular (Mehra *et al.*, 2013). Así mismo, se ha encontrado que EsxH (también conocido como antígeno TB10.4) es blanco de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ durante la inmunización con la vacuna BCG o en pacientes con la enfermedad y que es capaz de inducir la secreción de INF γ en linfocitos T de pacientes con TB (Skjøt *et al.*, 2002). Estas observaciones permiten apreciar la importancia de ESX-3 durante el proceso infeccioso; sin embargo, su función en la patogénesis de *M. tuberculosis* requiere ser mejor caracterizada (Gröschel *et al.*, 2016).

Sin embargo, es posible que el complejo EsxG·EsxH ayude a la secreción de otras proteínas, debido a las características de su estructura, la cual posee una hendidura en la superficie, que puede ser un sitio potencial para las interacciones proteína-proteína, así mismo contiene un sitio de unión específico a zinc, este sitio puede reflejar su rol esencial en la adquisición de iones zinc, o bien, que sea un punto de regulación dependiente de zinc para su interacción con proteínas funcionales asociadas (Ilghari *et al.*, 2011).

Por lo tanto, con la intención de evaluar si la sobreexpresión de los genes *esxG* y *esxH* tienen un efecto en la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*, en el presente proyecto nos propusimos sobreexpresar estos genes en *M. smegmatis* como modelo experimental de *M. tuberculosis* y evaluar el umbral de resistencia de los fármacos de primera línea en las cepas transformadas.

2.10 *Mycobacterium smegmatis* como cepa modelo de *M. tuberculosis*

Debido a que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular de humanos (Murray *et al.*, 2013) su manipulación se realiza en laboratorios de bioseguridad nivel III, aunado a esto, su tiempo de generación es de 20-24 h por lo que se requiere de tres a cuatro semanas para

obtener colonias en medio de cultivo sólido. En diversos estudios se ha utilizado a *M. smegmatis* como modelo de investigación de *M. tuberculosis*, lo anterior debido a las siguientes características que le confieren ventajas en su manejo: 1) es una micobacteria saprofítica, 2) no penetra en células epiteliales y 3) no tiene las propiedades patogénicas descritas en *M. tuberculosis* (Reyrat y Kahn, 2001).

Así mismo, *M. smegmatis* mc²155, puede ser de 10 a 100 veces más eficientemente transformada por electroporación que la cepa parental (Snapper *et al.*, 1990), posiblemente por modificaciones observadas en la composición y estructura de su pared celular (Etienne *et al.*, 2005). Por otro lado, la expresión de genes ectópicos en micobacterias se ha hecho posible debido a la construcción de vectores lanzadera (*shuttle vectors*) de *E.coli*-micobacterias, como el vector pMV261 (Strover *et al.*, 1991), el cual ha sido utilizado para la expresión de genes de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* (Bigi *et al.*, 1999; Daugelat *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2012).

Por lo anterior se ha considerado a esta cepa como modelo en el análisis de la expresión y replicación de genes micobacterianos, así como para la expresión de las proteínas de *M. tuberculosis* ya que posee chaperonas específicas de las micobacterias que permiten un correcto plegamiento de las proteínas expresadas de forma heteróloga (Bashiri *et al.*, 2007).

Es importante resaltar que la especie *M. smegmatis* contiene tres de los 5 clusters de los sistemas ESX, siendo estos el 1, 3 y 4 (que comparten entre el 60 y 75% de similitud a nivel proteína con *M. tuberculosis* H37Rv). Así mismo no se encontraron deleciones, cambios de marco de lectura o codones de paro en ninguno de los genes presentes en estos 3 clusters, por lo que se concluyó que estas tres regiones son funcionales en esta especie (Gey van Pittius *et al.*, 2001).

Debido a las razones anteriormente mencionadas, en la presente investigación se utilizó la cepa *M. smegmatis* mc²155 como modelo experimental de *M. tuberculosis* con el objetivo de evaluar el efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea.

3. JUSTIFICACIÓN

La TB es una enfermedad infecciosa que afecta aproximadamente a un tercio de la población, siendo la novena causa de muerte a nivel mundial, por lo que sigue siendo uno de los principales problemas de salud. En México el número de personas enfermas con TB continúa en aumento, siendo el estado de Nuevo León el tercer lugar en incidencia y número de defunciones debido a esta enfermedad. Así mismo, la TB farmacorresistente es una amenaza persistente que ha ganado interés en los últimos años y a pesar de que se han logrado avances significativos en la comprensión de las bases moleculares de la farmacorresistencia relacionándola directamente a mutaciones en genes específicos, en algunos de los casos no se cumple esta condición, lo que nos hace sugerir que la resistencia a fármacos puede estar vinculada con mecanismos adicionales. Recientemente en nuestro equipo de trabajo se observó que los genes *esxG* y *esxH* están diferencialmente expresados entre una cepa sensible y un aislado clínico multifarmacorresistente de *M. tuberculosis* sugiriendo su potencial vinculación con la farmacorresistencia, por lo que es de interés evaluar el efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis* como modelo experimental de *M. tuberculosis*, con el fin de identificar nuevos marcadores que apoyen a la detección temprana de cepas resistentes de *M. tuberculosis* para dar un tratamiento oportuno y aumentar su eficiencia, así como tener una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH confiere resistencia a los fármacos de primera línea en *M. smegmatis* como modelo experimental de *M. tuberculosis*.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG-EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis* como modelo experimental de *M. tuberculosis*

5.1 Objetivos particulares

1. Sobreexpresar los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis* mc²155.
2. Evaluar el efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG-EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis* mc²155.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo y mantenimiento de *M. smegmatis*

Se reactivó la cepa *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084) en medio líquido 7H9 suplementado con 10 % de ADC (albumina bovina, dextrosa, catalasa) y 0.05% de Tween 80. Se incubó a 37°C con agitación constante durante 24 h, posteriormente se resembró en 10 mL del medio 7H9 suplementado con ADC y en medio sólido 7H10 suplementado con 10% de OADC, los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h. Una porción del cultivo en medio sólido se conservó en 7H9 suplementado con 10% de ADC adicionado con 45% de glicerol y se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

6.2 Clonación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pET101/D-TOPO

Se realizó la clonación de la región codificante de los genes *esxG* y *esxH*, previamente amplificada a partir del DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (por Granados-Tristán AL), utilizando el kit comercial Champion TM pET101 Directional-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3 Subclonación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pMV261 en *Escherichia coli*

A partir de la construcción anterior, se realizó la subclonación de la región codificante de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pMV261. Para lo anterior, se realizó un ensayo de restricción enzimática utilizando la enzima *Bam*HI (NewEngland BioLabs, Ipswich, Massachusetts) para liberar la región codificante de los genes del vector en tránsito y a su vez para la linearización del vector pMV261. Cada reacción se incubó toda la noche a 37°C a 300 rpm. Posteriormente se llevó a cabo la desfosforilación del vector pMV261 con fosfatasa alcalina (Invitrogen Carlsbad, CA). Los fragmentos digeridos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y posteriormente se purificaron utilizando el Kit comercial GENE CLEAN Turbo (Qbiogene, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector pMV261 y la secuencia de los genes *esxG* y *esxH* se sometieron a una reacción de ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa (NewEngland BioLabs, Ipswich, Massachusetts), se incubó la reacción por 3 h a temperatura ambiente y después durante toda la noche a 4°C. Se realizó la transformación

por choque térmico de la cepa *E. coli* DH5 α con la construcción pMV261-*esxG:esxH*, y se seleccionaron aquellos candidatos que contuvieran el vector con el inserto.

6.4 Caracterización de la construcción pMV261-*esxG:esxH*

La caracterización de la construcción obtenida (pMV261-*esxG:esxH*) se realizó mediante PCR y secuenciación automatizada. Para el ensayo, se extrajo DNA plasmídico de los candidatos seleccionados utilizando el protocolo de lisis alcalina en minipreparación (Sambrook y Russell, 2001). El DNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, Delaware), y se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed Nucleic Acid (Biotium, Fremont, CA) utilizando el fotodocumentador MutiDoc-it Digital Imaging System (UVP, Upland, CA).

Para comprobar que las construcciones contuvieran el inserto, se caracterizaron mediante PCR bajo las condiciones indicadas en la Tabla 4 y la Figura 10, esperando obtener un fragmento de 626 pb, utilizando los *primers*:

- *esxG-F* 5'-GGATCCATGAGCCTTTTGGATGCTCATAT-3'
- *esxH-R* 5'-GGATCCCTAGCCGCCCCATTTGGC-3'

Tabla 4. Condiciones de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes *esxG:esxH*

	Inicial	Final	1 reacción (μ L)
Buffer	10 X	1 X	2.5
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.5
MgCl₂	50 mM	3.5 mM	1.75
<i>esxG-F</i>	100 ng/ μ L	5 ng/ μ L	1.0
<i>esxH-R</i>	100 ng/ μ L	5 ng/ μ L	1.0
DNA Taq polimerasa	5U/ μ L	0.625 U (0.025 U/ μ L)	0.125
DMSO	100%	5%	1.25
H₂O_{NF}	--	--	15.875
DNA	20 ng/ μ L	--	1.0
Volumen total			25

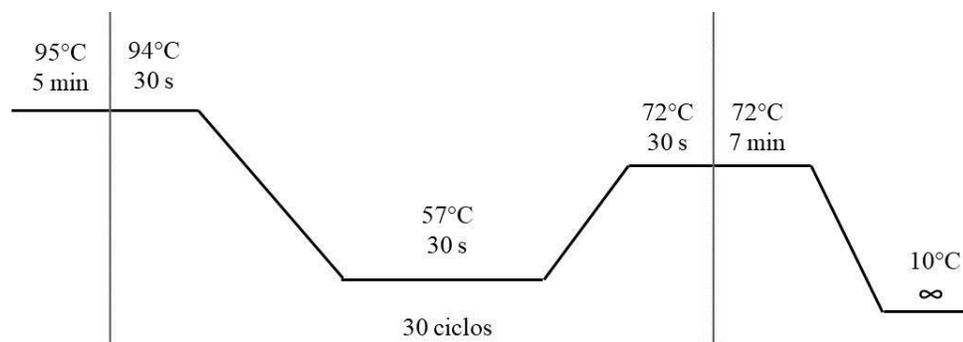


Figura 10. Programa para la amplificación de los genes *esxG:esxH*

Por otro lado, la identificación de la orientación del inserto se realizó mediante PCR y secuenciación. Para la PCR se utilizaron combinaciones de los *primers* pMV261-F 5'-GTTGTAGTGCTTGTGGTGGCA-3', *esxG-F* y *esxH-R*, bajo las condiciones indicadas en la Tabla 5 y Figura 11.

Tabla 5. Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR para la caracterización de la construcción pMV261-*esxG:esxH*.

	Inicial	Final	1 reacción (μL)
Buffer	10 X	1 X	2.5
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.5
MgCl₂	50 mM	1.5 mM	0.75
pMV261-F	100 ng/μL	5 ng/μL	1
<i>esxG-F</i>	100 ng/μL	5 ng/μL	1
<i>esxH-R</i>			
DNA Taq polimerasa	5U/μL	0.625 U (0.025 U/μL)	0.125
H₂O_{NF}	--	--	18.125
DNA	20 ng/μL	--	1
Volumen total			25

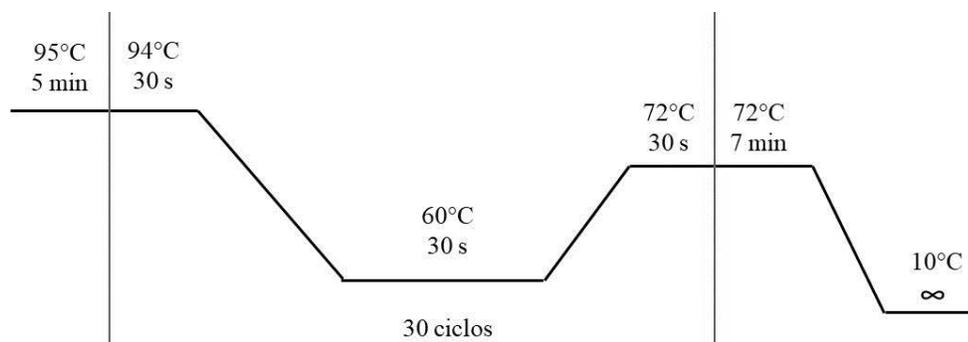


Figura 11. Programa para la amplificación de los fragmentos que definen la orientación del inserto en el vector pMV261-*esxG:esxH*.

Así mismo, se realizó secuenciación automatizada de ambos genes utilizando el equipo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para la reacción de marcaje se utilizó el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). Se utilizaron los *primers esxG-F* y *esxH-R* para secuenciar el producto de ambos genes. La mezcla para la reacción de marcaje y las condiciones de marcaje se indican en la Tabla 6 y la Figura 12. La secuencia obtenida se analizó a partir de un alineamiento BLAST utilizando la base de datos NCBI y los programas CLC Sequence Viewer 7 y Seqscape V2.7.

Tabla 6. Mezcla para la reacción de marcaje

Reactivos	1 reacción (µL)
Mezcla de reacción Big Dye Terminator v3.1	4
Buffer de secuenciación 5X	4
<i>Primer</i>	1
H ₂ O _{NF}	10
DNA	1
Volumen total	20

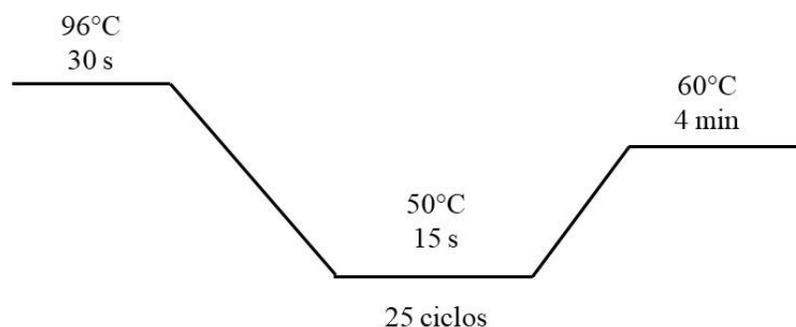


Figura 12. Condiciones de la reacción de marcaje.

6.5 Purificación del DNA plasmídico de *E. coli* DH5 α -pMV261-*esxG:esxH*

Una vez identificados los candidatos, las bacterias de *E. coli* DH5 α transformadas se crecieron en 3 mL de medio LB con kanamicina [75 μ g/mL], se incubaron a 37 °C durante toda la noche a 300 rpm. El DNA plasmídico se purificó utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el DNA plasmídico purificado por espectrofotometría y se visualizó por electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

6.6 Transformación de *M. smegmatis* mc²155 con la construcción pMV261-*esxG:esxH*

La cepa *M. smegmatis* mc²155 se transformó con la construcción pMV261-*esxG:esxH* mediante electroporación. Brevemente, el cultivo de *M. smegmatis* se creció en medio 7H9 suplementado con 10% ADC y 0.05% Tween 80, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, posteriormente las bacterias se centrifugaron y la pastilla obtenida se resuspendió en glicerol al 10 % con Tween 80. Se colocaron entre 1-10 μ L de DNA plasmídico (pMV261-*esxG:esxH*) en celdas de electroporación previamente enfriadas y a cada una se agregaron 400 μ L de la suspensión de bacterias. La mezcla se sometió a electroporación (GenePulser Xcell) con las condiciones de un pulso de 2.5 kV, 1000 Ohms, 25 μ FD. Posteriormente, las micobacterias se resuspendieron en el medio 7H9 suplementado con 10% ADC conteniendo kanamicina [75 μ g/mL] como fármaco de selección y se incubó a 37°C por 2 h a 300 rpm. Finalmente se sembraron en medio sólido para observar candidatos, las placas se incubaron a 37 °C durante 3 d.

6.7 Extracción de RNA total de *M. smegmatis* y RT-PCR punto final

Para identificar la expresión de los genes *esxG* y *esxH* en la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, se realizó la amplificación de ambos genes mediante RT-PCR punto final. Para ello, se extrajo RNA total con el siguiente protocolo; brevemente el cultivo de 10 mL en fase logarítmica se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 800 µL del reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), se transfirió a tubos de FastPrep conteniendo un matiz de esferas de sílica de 0.1 mm (Matriz B, MP Biomedicals). Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para la adición de cloroformo y la precipitación del RNA utilizando isopropanol y un lavado con etanol al 70%. La cuantificación y pureza del RNA total aislado se determinó por espectrofotometría con luz UV y la integridad se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Biotium, Hayward, EUA). El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

Posteriormente, el RNA total se trató con la enzima *DNaseI* para digerir el DNA genómico presente en la muestra. Se realizó la síntesis de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA) y *primers* aleatorios siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. El cDNA obtenido se utilizó como templado para los ensayos de PCR punto final usando los *primers* *esxG*-F y *esxH*-R para demostrar la expresión de ambos genes en la cepa transformada.

6.8 Western Blot del complejo EsxG·EsxH

Se realizó un ensayo de Western Blot para la detección del complejo de proteínas EsxG·EsxH con el fin de confirmar su sobreexpresión en la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Brevemente, se realizó la extracción de proteínas a partir del lisado celular y filtrado del cultivo (sobrenadante) de *M. smegmatis*-pMV261 (control) y de *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, siguiendo el protocolo descrito por Larsen *et al.*, 2007, utilizando el equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) para la lisis celular y las Unidades Amicon Ultra 15 (Millipore, Burlington, Massachusetts) con un corte de peso molecular de 10 kDa para concentrar las proteínas del sobrenadante, para lo cual se centrifugó la muestra a 5,000 g durante 15-40 min en un rotor de ángulo fijo.

Posterior a la extracción, se separaron las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando el equipo Mini-Protean Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA), siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó la transferencia semi seca de las proteínas a una membrana de PVDF 0.2 μm (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando el equipo Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell (Bio-Rad, Hercules, CA). Se realizó el bloqueo de la membrana utilizando leche deslactosada en polvo diluida al 5% con TBST 1X durante 1 h a 300 rpm. Posteriormente, se realizó la dilución del anticuerpo primario de cada proteína (Genemed Synthesis, Inc, San Antonio, TX), y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C a 300 rpm, para luego realizar lavados consecutivos de 5, 10 y 15 min con TBST 1X. Se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo del kit ECL™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Chicago, Illinois) a una dilución 1:20,000 y se dejó incubando durante 1 h a temperatura ambiente a 300 rpm, después se realizaron lavados consecutivos de 5, 10 y 15 min con TBST 1X. Por último, se reveló la membrana, dentro de un cuarto oscuro bajo diferentes tiempos de exposición utilizando los reactivos de detección del kit ECL™ Western Blotting Analysis System y los reactivos de revelado y fijación GBX (Carestream Health, Inc, Rochester, NY).

6.9 Evaluación del efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis*.

Se evaluó la actividad *in vitro* de los fármacos de primera línea de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* utilizando el método de microdilución en placa con el compuesto resazurina (resazurin microtiter assay [REMA]) (Palomino *et al*, 2002; Agrawal *et al.*, 2015). Se realizaron diluciones seriales de cada uno de los fármacos de primera línea para evaluar un rango de concentraciones específico para cada uno de ellos (Tabla 7; Arriaga-Guerrero, 2016). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se determinaron a partir del cambio de color azul a rosa que pone en evidencia el crecimiento bacteriano, ya que las bacterias activas reducen la resazurina no fluorescente (azul) a resorufina fluorescente (rosa), dando una medida cuantificable directa de la actividad metabólica de la bacteriana (Elshikh *et al.*, 2016).

Tabla 7. Rango de concentración de los fármacos en el método de microdilución en placa para *M. smegmatis*.

Fármaco	Abreviatura	Rangos de concentración (µg/mL)
Isoniazida	INH	256 - 0.25
Rifampicina	RIF	50 - 0.05
Etambutol	EMB	8 - 0.05
Pirazinamida	PZA	200 - 0.2

(Arriaga-Guerrero, 2016)

Por otro lado, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia de los fármacos de primera línea de *M. smegmatis*-pMV261 y *M. smegmatis*pMV261-*esxG:esxH*. Se creció cada una de las cepas en medio de cultivo 7H9 suplementado con ADC al 10%, conteniendo kanamicina [20 µg/mL] y con las concentraciones a evaluar de cada uno de los fármacos. Los cultivos se incubaron a 37°C a 300 rpm y se monitoreó el crecimiento micobacteriano en unidades de McFarland (McF) usando el equipo DensiCHEK™ plus VITED (BIOMERIEUX) tomando lecturas cada 3 h durante 27 h.

6.10 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico mediante la comparación de las pendientes de las curvas de crecimiento en presencia de los fármacos de primera línea de las cepas de *M. smegmatis*-pMV261 y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Los resultados se consideran como significativos cuando $p < 0.05$ y altamente significativos cuando $p < 0.01$.

7. RESULTADOS

7.1 Clonación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pET101/D-TOPO

La región codificante de los genes *esxG* y *esxH* previamente amplificada a partir del DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, se clonó en el vector pET101/D-TOPO. Con la construcción obtenida, se transformó la cepa *E. coli* One Shot® TOP10 por choque térmico, con la finalidad de propagar el vector. Se realizó extracción de DNA plasmídico de 5 de los candidatos obtenidos y se visualizó en un gel de agarosa al 1% observando dos bandas de diferente peso molecular debido a las conformaciones del DNA plasmídico (Figura 13), posteriormente los candidatos se caracterizaron por PCR usando los *primers* *esxG*-F y *esxH*-R, obteniendo una banda de aproximadamente 626 pb, la cual corresponde al producto de amplificación de ambos genes (Figura 14).

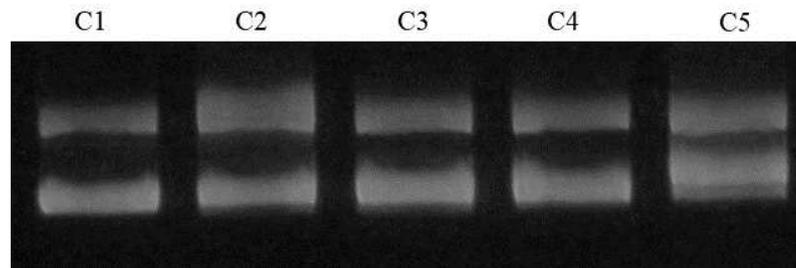


Figura 13. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pET101/D-TOPO-*esxG*:*esxH*. C: candidato.

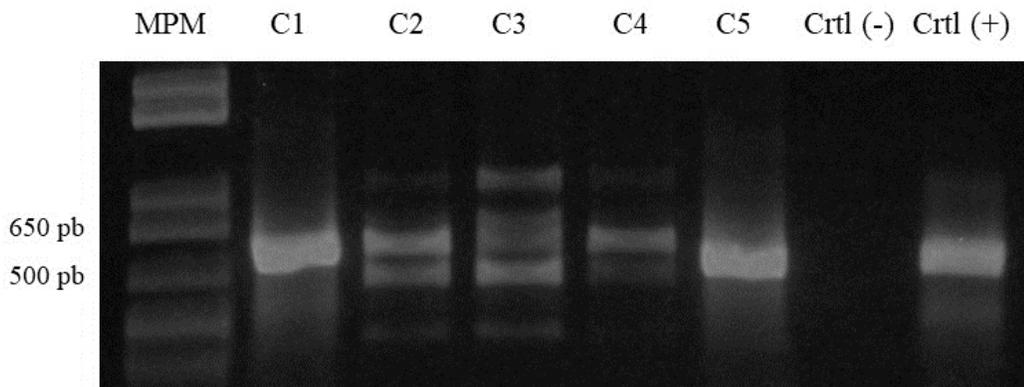


Figura 14. Amplificación por PCR de los genes *esxG* y *esxH* a partir del DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pET101/D-TOPO-*esxG*:*esxH*. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C: Candidato; Ctrl (-): control negativo (templado H₂O_{NF}); Ctrl (+): control positivo (templado producto de PCR de *esxG* y *esxH*).

7.2 Subclonación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pMV261

La construcción pET101/D-TOPO-*esxG:esxH* se purificó a partir del Candidato 1 (Figura 14) y posteriormente fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI, así mismo, se linearizó el vector micobacteriano pMV261 utilizando la misma enzima. Los productos de digestión se observaron en un gel de agarosa (Figura 15) a partir del cual, se recuperaron los fragmentos de los genes *esxG* y *esxH* y el vector pMV261 linearizado, con la finalidad de purificarlos con un kit comercial. Se observó buena integridad de los fragmentos purificados en gel de agarosa (Figura 16).

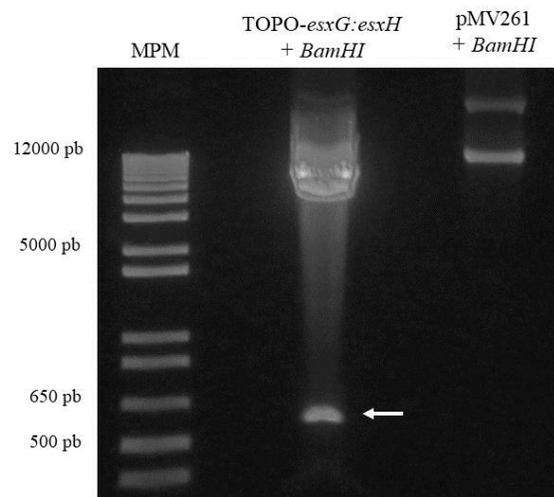


Figura 15. Digestión enzimática de la construcción pET101/D-TOPO-*esxG:esxH* y del vector pMV261 con *Bam*HI. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. La flecha indica el fragmento correspondiente a los genes *esxG* y *esxH*.

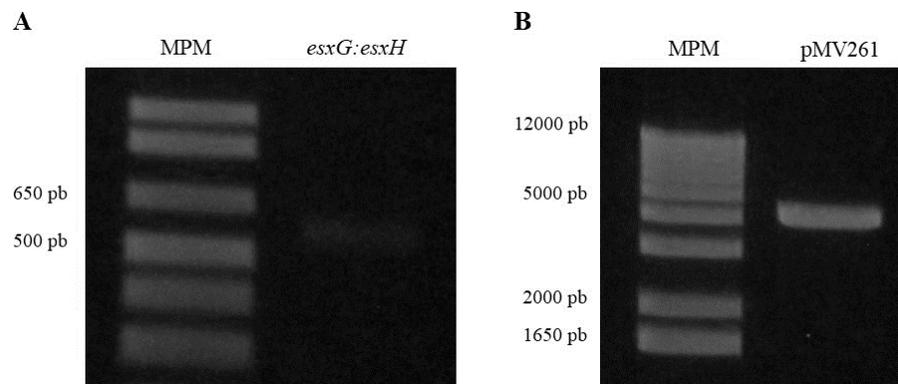


Figura 16. Purificación del fragmento de los genes *esxG* y *esxH* y del vector pMV261 linearizado. A) Purificación de la región codificante de los genes *esxG* y *esxH*. B) Purificación del vector pMV261 linearizado y desfosforilado. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder.

La clonación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pMV261 se realizó mediante una reacción de ligación utilizando los productos de la digestión purificados (Figura 16). A partir de la construcción obtenida (pMV261-*esxG:esxH*) se transformó la cepa *E. coli* DH5 α por choque térmico, obteniendo diversos candidatos en agar Luria Bertani (LB) con kanamicina [75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] utilizado como fármaco de selección.

7.3 Caracterización de la construcción pMV261-*esxG:esxH*

Con la finalidad de comprobar que los candidatos contenían el vector pMV261 con el inserto de ambos genes, se realizó extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Figura 17), y posteriormente se amplificaron los genes *esxG* y *esxH*, observando en los candidatos que contenían la construcción una banda de aproximadamente 626 pb, la cual corresponde al producto de amplificación de ambos genes (Figura 18).

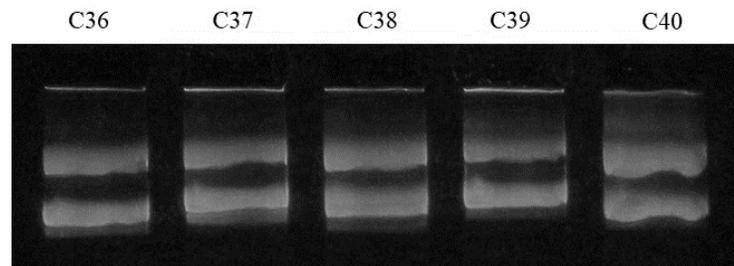


Figura 17. Extracción de DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pMV261-*esxG:esxH*. C: candidato

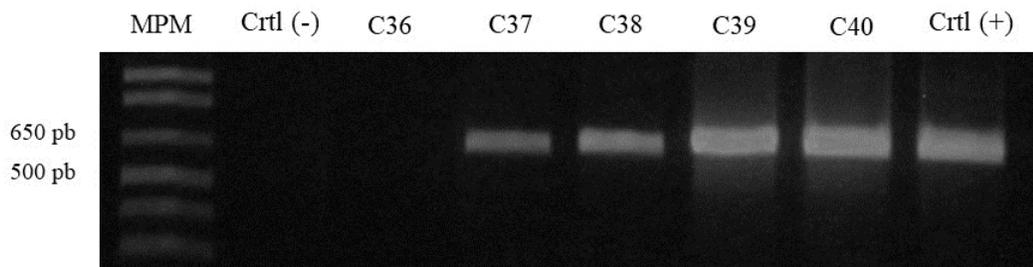


Figura 18. Amplificación por PCR de los genes *esxG* y *esxH* a partir del DNA plasmídico de los candidatos de la construcción pMV261-*esxG:esxH*. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C: Candidato; Ctrl (-): control negativo ($\text{H}_2\text{O}_{\text{NF}}$); Ctrl (+): control positivo (templado producto de PCR de *esxG* y *esxH*).

Una vez identificados los candidatos que contenían la construcción, se caracterizaron por PCR y secuenciación, con el objetivo de obtener un candidato con el inserto en dirección sentido. Para la PCR se utilizaron combinaciones de los *primers* pMV261-F, *esxG*-F y *esxH*-R (Figura 19).

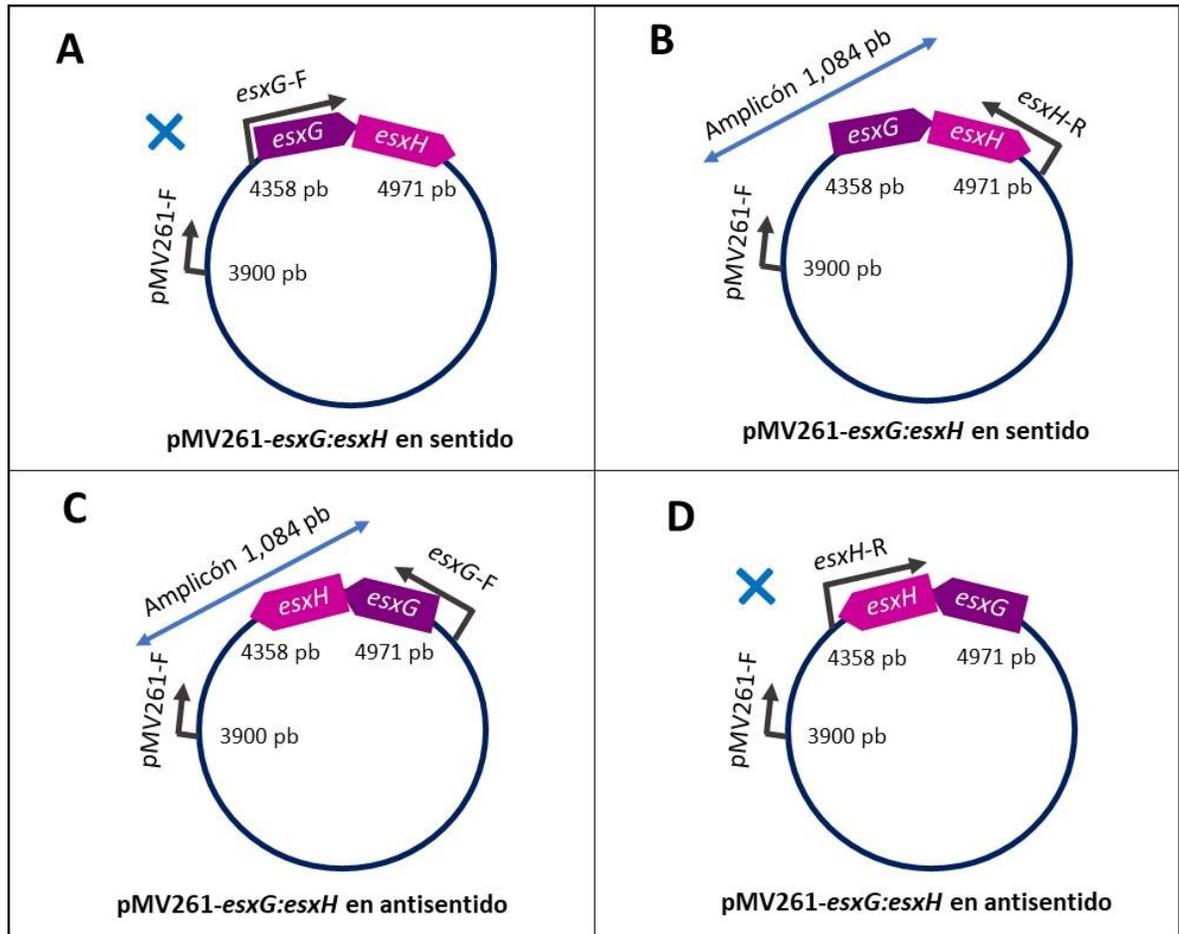


Figura 19. Esquema para la identificación de la orientación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pMV261 por PCR. Las combinaciones de los *primers* de los paneles A y B identificarían al candidato con el inserto en dirección sentido y la de los paneles C y D en dirección antisentido. R: *primer* reverso; F: *primer* forward, la X indica ausencia de amplificación.

A partir del DNA plasmídico del candidato 39, se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 1,084 pb, utilizando la combinación de los *primers* pMV261-F y *esxH*-R, identificando que contenía la construcción con los genes en dirección sentido (Figura 20).

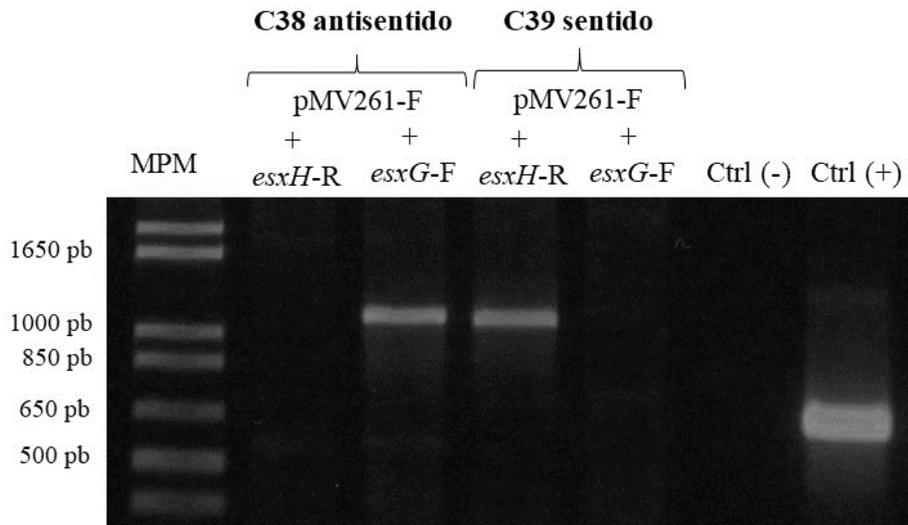


Figura 20. Identificación de la orientación de los genes *esxG* y *esxH* en el vector pMV261 por PCR. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C: Candidato; Ctrl (-): control negativo (templado H₂O_{NF}); Ctrl (+): control positivo (templado DNA plasmídico de *E. coli* - pMV261-*esxG:esxH*).

La confirmación de la orientación del inserto y la fidelidad de la secuencia se realizaron mediante secuenciación automatizada utilizando como templado el DNA plasmídico purificado del candidato 39, utilizando los *primers* *esxG*-F y *esxH*-R, con el fin de secuenciar ambos genes. Las secuencias obtenidas se alinearon y se analizaron utilizando como referencia la secuencia de la construcción *in silico* de pMV261-*esxG:esxH*; la región codificante de los genes fue tomada de la secuencia de referencia del GenBank con No. NC_000962.3 de la cepa H37Rv ATCC 27294 (Figura 21).

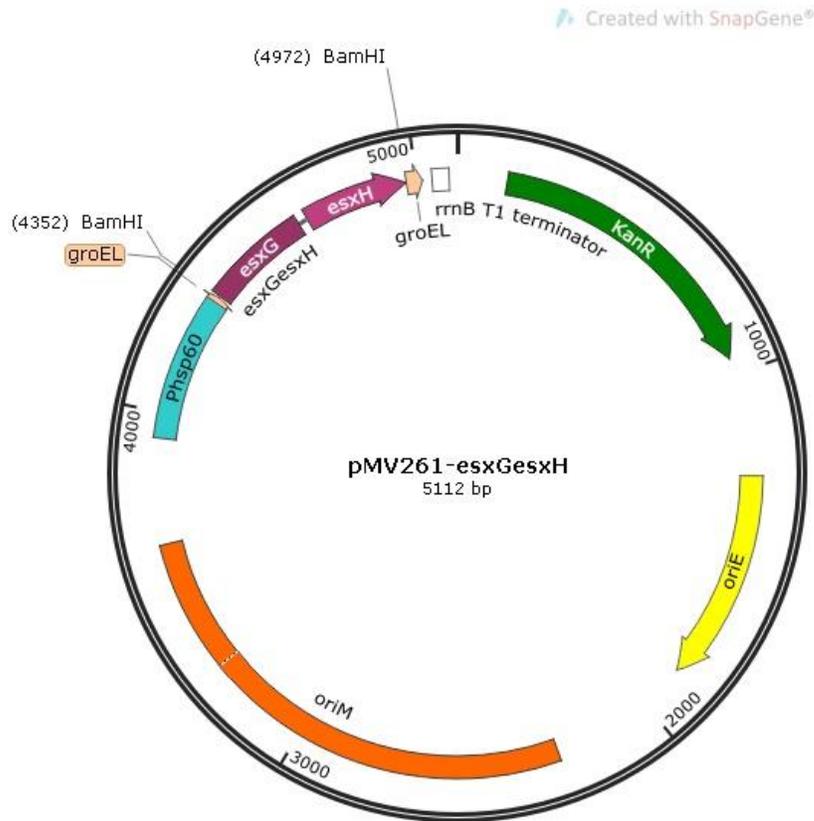
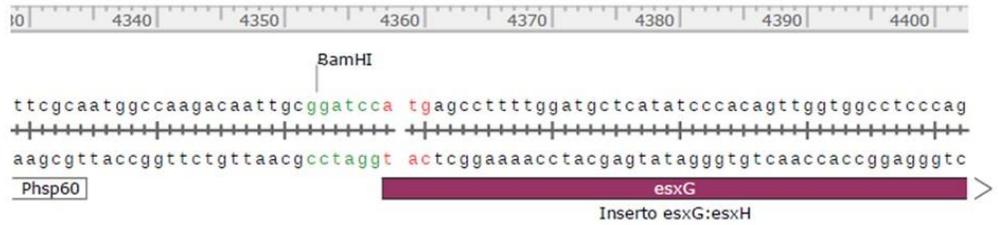


Figura 21. Mapa de la construcción pMV261-*esxG*:*esxH* in silico. Se muestran en color morado y rosa el inserto de los genes *esxG* y *esxH*, respectivamente, el sitio de corte de la enzima *Bam*HI, en color verde el gen de resistencia a kanamicina, en color amarillo el origen de replicación para *E. coli*, en color naranja el origen de replicación para micobacterias, y en azul turquesa el promotor de la proteína hsp60. Secuencia generada en el programa SnapGene® 4.2.1.

Al analizar el alineamiento, se localizó el sitio de corte de la enzima *Bam*HI, el codón de inicio y término de cada uno de los genes y posibles mutaciones. No se encontraron mutaciones en la secuencia codificante de los genes, pero se identificó una inserción de una adenina (A) antes del codón de inicio del gen *esxG*, sin embargo, esta inserción no modifica el marco de lectura de la proteína EsxG (Figuras 22 y 23).

Por lo anteriormente mencionado, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con la construcción pMV261-*esxG*:*esxH* correspondiente al candidato 39 para ensayos posteriores de la presente investigación. La cepa se congeló con medio LB conteniendo glicerol al 60% y se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.



pMV261-esxG:esxH *in silico*
 Secuencia con primer esxH-R
 Secuencia con primer esxG-F

```

t t c g c a a t g g c c a a g a c a a t t g c g g a t c c a t g a g c c t t t t g g a t g c t c a t a t c c c a c a g t t g g t g g c c t c c c a g
T T C G C A A T G G C C A A G A C A A T T G C G G A T C C A A T G A G C C T T T T G G A T G C T C A T A T C C C A C A G T T G G T G G C C T C C C A G
CCAG
  
```



pMV261-esxG:esxH *in silico*
 Secuencia con primer esxH-R
 Secuencia con primer esxG-F

```

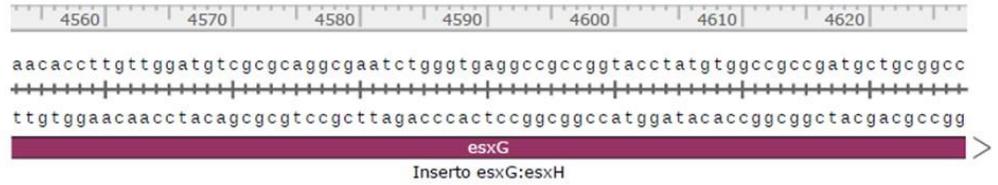
t c g g c g t t t g c c g c c a a g g c g g g g c t g a t g c g g c a c a c g a t c g g t c a g g c c g a g c a g g c g g c g a t g t c g g c t c a g
T C G G C G T T T G C C G C C A A G G C G G G G C T G A T G C G G C A C A C G A T C G G T C A G G C C G A G C A G G C G G C G A T G T C G G C T C A G
T C G G C G T T T G C C G C C A A G G C G G G G C T G A T G C G G C A C A C G A T C G G T C A G G C C G A G C A G G C G G C G A T G T C G G C T C A G
  
```



pMV261-esxG:esxH *in silico*
 Secuencia con primer esxH-R
 Secuencia con primer esxG-F

```

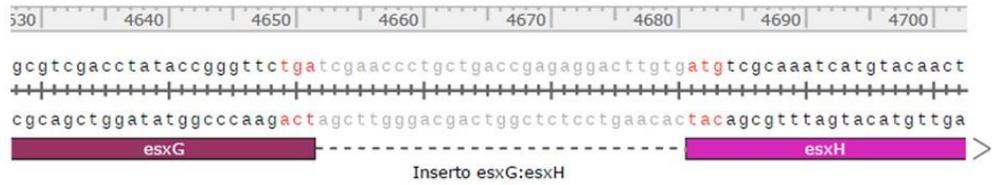
g c g t t t c a c c a g g g g a g t c g t c g g c g g c g t t t c a g g c c g c c a t g c c g g t t t g t g g c g g c g g c c c a a a g t c
G C G T T T C A C C A G G G G A G T C G T C G G C G G C G T T T C A G G C C G C C C A T G C C C G G T T T G T G G C G G C G G C C C A A A G T C
G C G T T T C A C C A G G G G A G T C G T C G G C G G C G T T T C A G G C C G C C C A T G C C C G G T T T G T G G C G G C G G C C C A A A G T C
  
```



pMV261-esxG:esxH *in silico*
 Secuencia con primer esxH-R
 Secuencia con primer esxG-F

```

a a c a c c t t g t t g g a t g t c g c g c a g g c g a a t c t g g g t g a g g c c g c g g t a c c t a t g t g g c c g c g a t g c t g c g g c c
A A C A C C T T G T T G G A T G T C G C G C A G G C G A A T C T G G G T G A G G C C G C C G T A C C T A T G T G G C C G C C G A T G C T G C G G C C
A A C A C C T T G T T G G A T G T C G C G C A G G C G A A T C T G G G T G A G G C C G C C G T A C C T A T G T G G C C G C C G A T G C T G C G G C C
  
```



pMV261-esxG:esxH *in silico*
 Secuencia con primer esxH-R
 Secuencia con primer esxG-F

```

g c g t c g a c c t a t a c c g g g t t c t g a t c g a a c c t g c t g a c c g a g a g g a c t t g t g a t g t c g c a a a t c a t g t a c a a c t
G C G T C G A C C T A T A C C G G G T T C T G A T C G A A C C C T G C T G A C C G A G A G G A C T T G T G A T G T C G C A A A T C A T G T A C A A C T
G C G T C G A C C T A T A C C G G G T T C T G A T C G A A C C C T G C T G A C C G A G A G G A C T T G T G A T G T C G C A A A T C A T G T A C A A C T
  
```

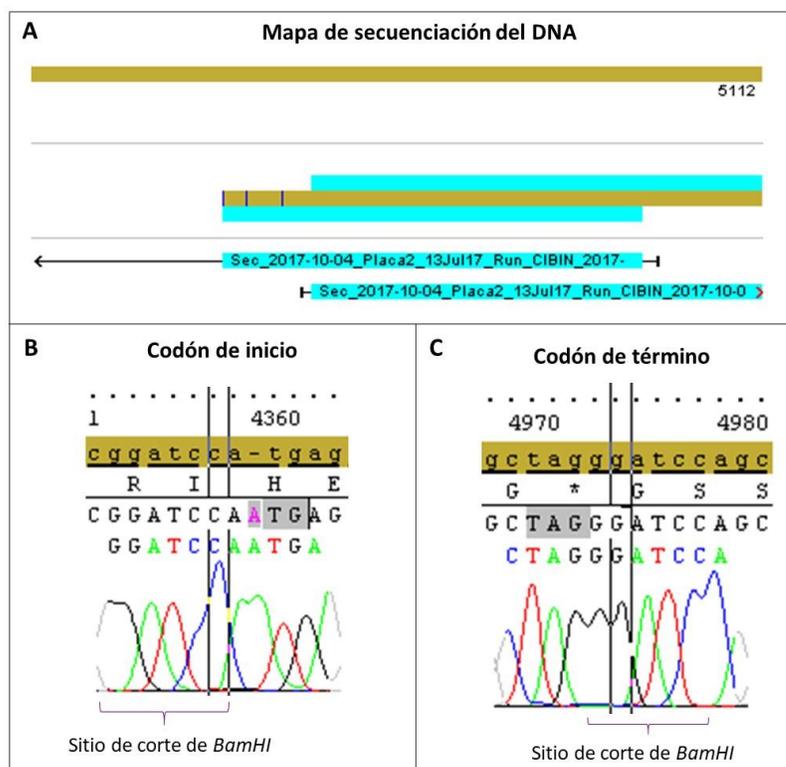



Figura 23. Secuenciación automatizada de la construcción pMV261-*esxG:esxH*. A) Mapa general de la secuenciación; en azul se muestra la región de la secuencia obtenida con cada uno de los *primers*, las flechas indican la dirección de la secuencia, en café se indica la secuencia de referencia de los genes *esxG* y *esxH*. B) Electroferograma del codón de inicio del gen *esxG* y el sitio de corte de *Bam*HI. C) Electroferograma del codón de terminación del gen *esxH* y el sitio de corte de *Bam*HI (GGATCC). Secuencia analizada con el programa SeqScape® Software versión 2.7.

7.4 Purificación del DNA plasmídico de *E. coli* DH5α-pMV261-*esxG:esxH*

Se realizó la purificación del DNA plasmídico de la cepa *E. coli* DH5α-pMV261-*esxG:esxH*, utilizando el kit comercial de QIAGEN. Se cuantificó la extracción obteniendo una concentración de 44.7 ng/μL y una relación 206/280 nm de 1.94 (Figura 24). El DNA plasmídico purificado se utilizó para ensayos posteriores.

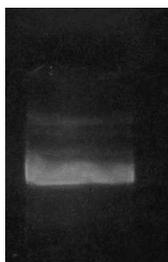


Figura 24. Purificación de la construcción pMV261-*esxG:esxH*.

7.5 Transformación de *M. smegmatis* mc²155 con la construcción pMV261-*esxG:esxH*

La transformación de *M. smegmatis* mc²155 con la construcción pMV261-*esxG:esxH* se realizó mediante electroporación; después de 4 días de incubación a 37°C se obtuvieron diversos candidatos en agar 7H10 suplementado con 10% de OADC y conteniendo kanamicina [20 µg/mL] como fármaco de selección (Figura 25).

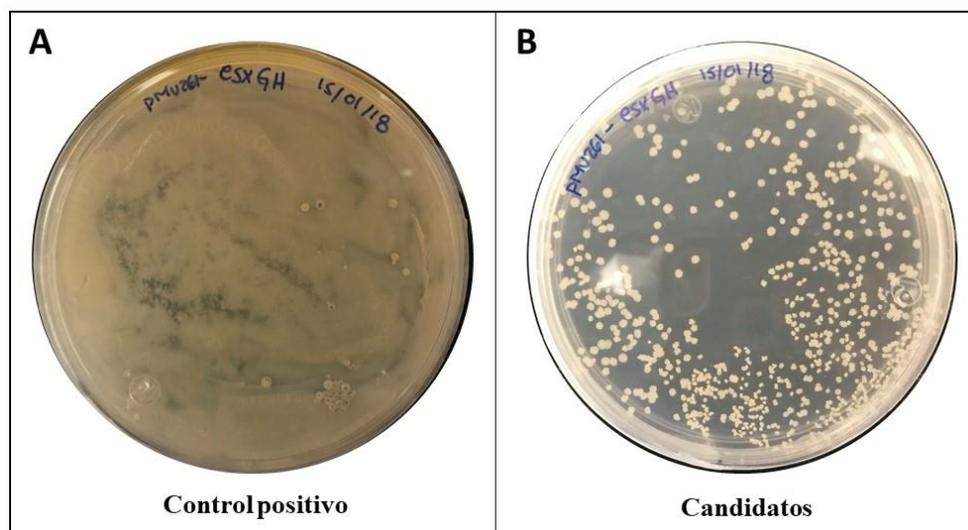


Figura 25. Transformación de *M. smegmatis* mc²155 con la construcción pMV261-*esxG:esxH*. A) Control de viabilidad; se observa crecimiento bacteriano en toda la superficie del medio 7H10 sin kanamicina. B) Candidatos obtenidos en agar 7H10 con kanamicina [20 µg/mL]; se observan múltiples colonias de posibles candidatos.

Posteriormente se aislaron 5 candidatos utilizando el medio de cultivo 7H10 suplementado con OADC y conteniendo kanamicina [20 µg/mL], y se realizó extracción de DNA plasmídico del candidato 1. Se comprobó que dicho candidato contenía la construcción pMV261-*esxG:esxH* al caracterizarlo por PCR punto final, amplificando los genes *esxG* y *esxH*, obteniendo una banda de aproximadamente 626 pb, la cual corresponde al producto de amplificación de ambos genes (Figura 26). Por lo tanto, se utilizó la cepa de *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* correspondiente al candidato 1 para los ensayos posteriores de la presente investigación. La cepa se congeló en medio de almacenamiento para *M. smegmatis* y se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

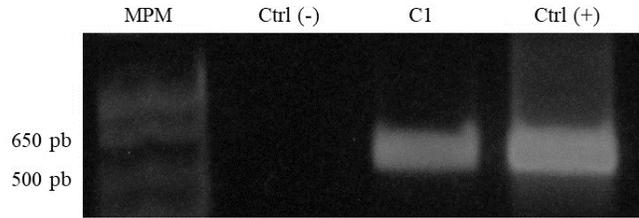


Figura 26. Caracterización por PCR punto final del candidato 1 transformado con la construcción pMV261-*esxG:esxH*. MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C: Candidato; Ctrl (-): control negativo (templado H₂O_{NF}); Ctrl (+): control positivo (templado DNA plasmídico de *E.coli* - pMV261-*esxG:esxH*).

7.6 Extracción de RNA total de *M. smegmatis* y RT-PCR punto final

Para identificar la expresión de los genes *esxG* y *esxH* en la cepa transformada se realizó una amplificación de ambos genes mediante RT-PCR punto final. Para ello, se realizó la extracción del RNA total de las cepas *M. smegmatis*-pMV261 (control) y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Se obtuvo una concentración y pureza del RNA total de cada extracción suficiente para los siguientes ensayos (Tabla 8). Posteriormente se realizó tratamiento con *DNasaI* con la finalidad de eliminar el DNA genómico y plasmídico de cada muestra, para evitar interferencias en los ensayos de expresión. La integridad del RNA total de cada extracción antes y después del tratamiento con *DNasaI*, se observó en un gel de agarosa al 1% (Figura 27).

Tabla 8. Cuantificación y pureza del RNA total de cepas de *M. smegmatis*.

Cepa	RNA [ng/μL]	A260/280
<i>M. smegmatis</i> -pMV261	1,514.6	1.91
<i>M. smegmatis</i> -pMV261- <i>esxG:esxH</i>	1,164.8	1.93

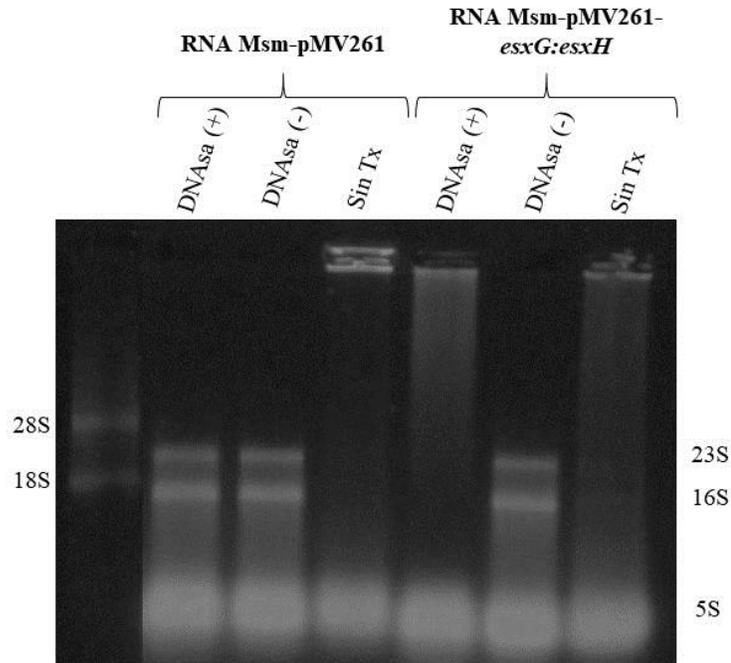


Figura 27. Extracción de RNA total de cepas de *M. smegmatis* tratado con *DNasaI*. Se indican las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales observadas. Ctrl (+): control positivo (RNA eucariota); Sin Tx: Sin tratamiento (la muestra no fue sometida a la incubación de 37°C por 30 min y 95°C por 5 min); Msm: *M. smegmatis*.

Se realizó una reacción de retrotranscripción del RNA total de cada extracción con la enzima M-MLV-RT. A partir del DNA complementario (cDNA) que se obtuvo, se amplificó por RT-PCR punto final el gen constitutivo *sigA* de *M. smegmatis* utilizando *primers* que amplifican una región interna del gen (*sigA*-IF2 y *sigA*-IR3), obteniendo una banda de 551 pb (Figura 28). Esta amplificación se realizó con la finalidad de comprobar la funcionalidad del RNA.

Al analizar los resultados, se observó una amplificación en la muestra del cDNA de *M. smegmatis*-pMV261 que fue tratada con *DNasaI* y que no se le añadió retrotranscriptasa (RT), esto es debido a trazas de DNA genómico presente en la muestra (Figura 28A).

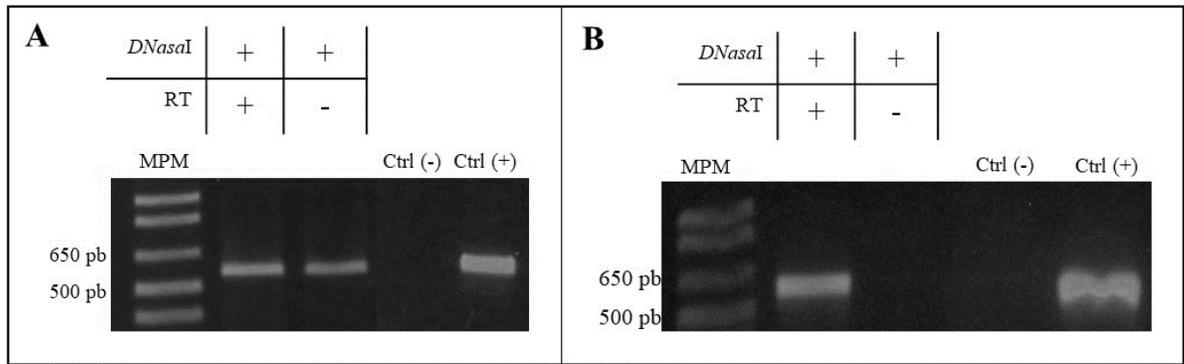


Figura 28. Amplificación del gen constitutivo *sigA*. Producto de amplificación del gen *sigA* de 551 pb a partir del cDNA de A) *M. smegmatis*-pMV261 y B) *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Símbolos (+) o (-): adición o no adición de las enzimas *DNaseI* o retrotranscriptasa (RT); MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C: Candidato; Ctrl (-): control negativo (templado H₂O_{NF}); Ctrl (+): control positivo (templado DNA genómico de *M. smegmatis*).

Posteriormente se amplificaron los genes *esxG* y *esxH* a partir del cDNA obtenido anteriormente de ambas cepas, y se confirmó su expresión únicamente en la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* (Figura 29).

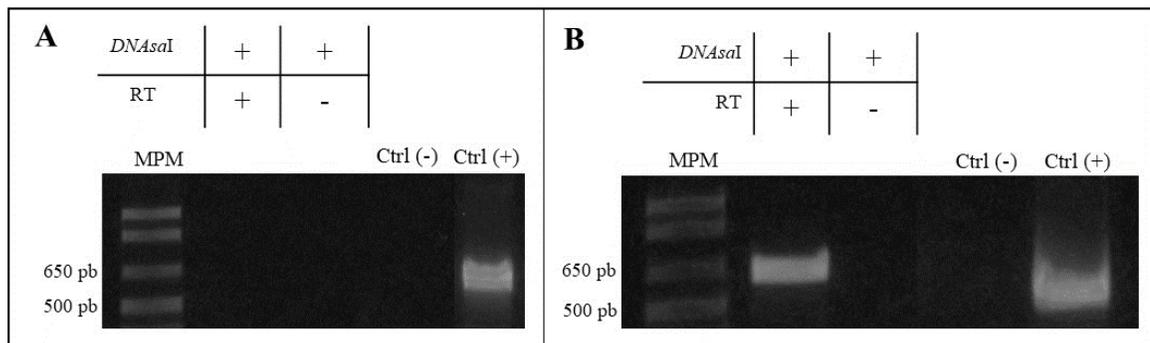


Figura 29. Amplificación de los genes *esxG* y *esxH*. Producto de amplificación de los genes *esxG* y *esxH* de 629 pb a partir del cDNA de A) *M. smegmatis*-pMV261 y B) *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Signos (+) o (-): adición o no adición de las enzimas *DNaseI* o retrotranscriptasa (RT); MPM: Marcador de Peso Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; C: Candidato; Ctrl (-): control negativo (templado H₂O_{NF}); Ctrl (+): control positivo (templado DNA plasmídico de *E.coli*-pMV261-*esxG:esxH*).

7.7 Western Blot del complejo EsxG·EsxH

Se realizó la extracción de proteínas a partir del lisado celular (pastilla) y sobrenadante del cultivo de las cepas *M. smegmatis*-pMV261 (control) y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Posteriormente se realizó un ensayo de Western Blot preliminar de las

proteínas de la cepa transformada con el fin de detectar cualitativamente a la proteína EsxG, observando una banda de aproximadamente 10 kDa, correspondiente al peso molecular de la proteína que es de 9.8 kDa (Figura 30).

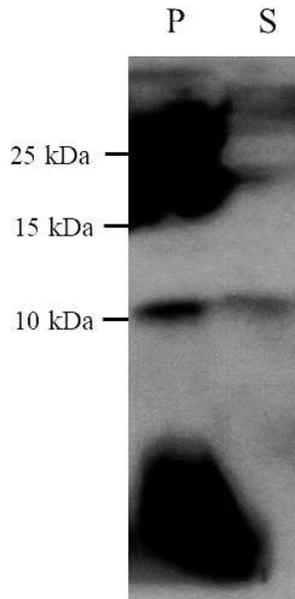


Figura 30. Western Blot de la proteína EsxG de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. MPM: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; P: proteínas de la pastilla; S: proteínas del sobrenadante del cultivo.

Al comparar los resultados con respecto a las proteínas de la cepa control, se observó que la banda de 10 kDa únicamente se detectó en la extracción de proteínas de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, tanto en la pastilla (con una banda de mayor intensidad), como en el sobrenadante del cultivo (Figura 31), por lo que se comprobó que la proteína EsxG se está expresando en la cepa transformada, y que se encuentra dentro de la célula y a su vez está siendo secretada en menor cantidad.

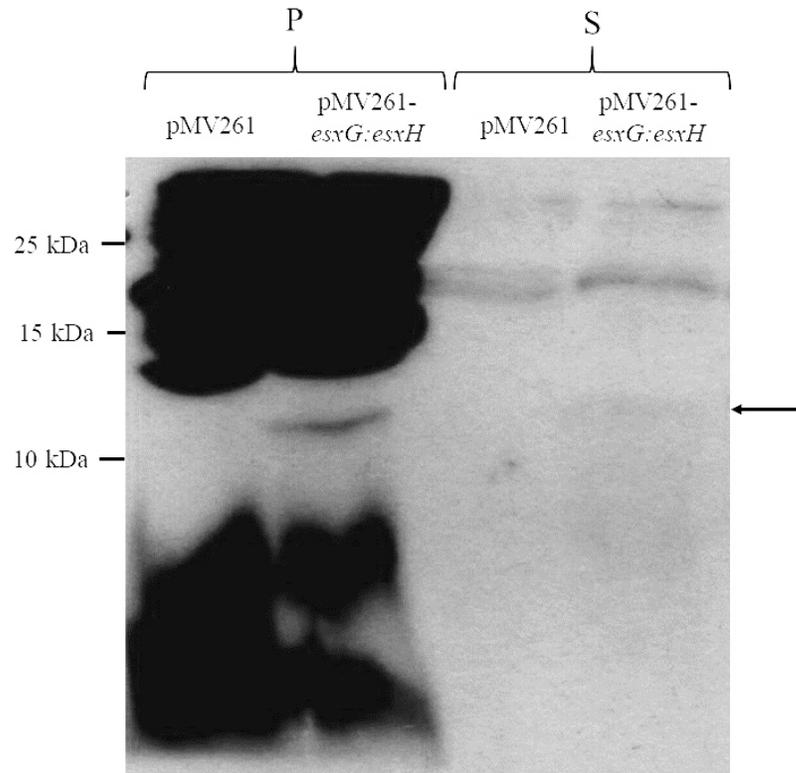


Figura 31. Western Blot de la proteína EsxG. Extracción de proteínas de las cepas *M. smegmatis*-pMV261 y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. MPM: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. La flecha indica la banda observada en el sobrenadante. P: proteínas de la pastilla; S: proteínas del sobrenadante del cultivo.

Así mismo, se realizó un ensayo de Western Blot preliminar para detectar cualitativamente a la proteína EsxH a partir de la pastilla y el sobrenadante del cultivo de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, observando en el sobrenadante una banda de aproximadamente 10 kDa, correspondiente al peso molecular de la proteína que es de 10.4 kDa. Sin embargo, en las proteínas de la pastilla no se pudo identificar una banda definida, ya que se observó un barrido que inicia a la altura de 10 kDa del marcador de peso molecular (Figura 32).

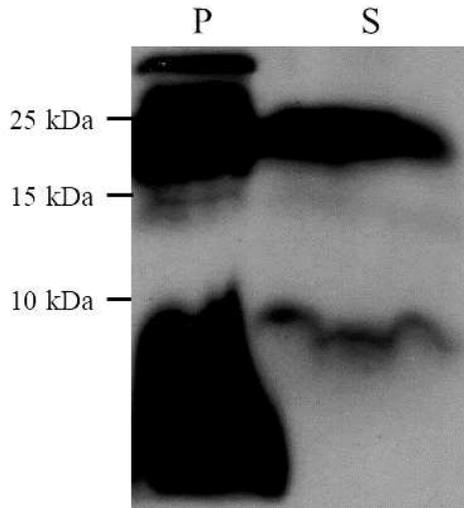


Figura 32. Western Blot de la proteína EsxH de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. MPM: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. P: proteínas de la pastilla; S: proteínas del sobrenadante del cultivo

7.8 Evaluación del efecto de la sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis*

Con la finalidad de identificar si los genes *esxG* y *esxH* se encuentran involucrados en la resistencia a fármacos de primera línea, se realizó *in vitro* las pruebas de susceptibilidad a los fármacos RIF, INH y EMB por medio del ensayo de reducción de rezasurina por microdilución en placa con la cepa de *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) de cada fármaco.

Primero se determinaron las CMI's de *M. smegmatis* mc²155 las cuales fueron: RIF 0.8 µg/mL, INH 32 µg/mL y EMB 0.5 µg/mL (Figura 33).

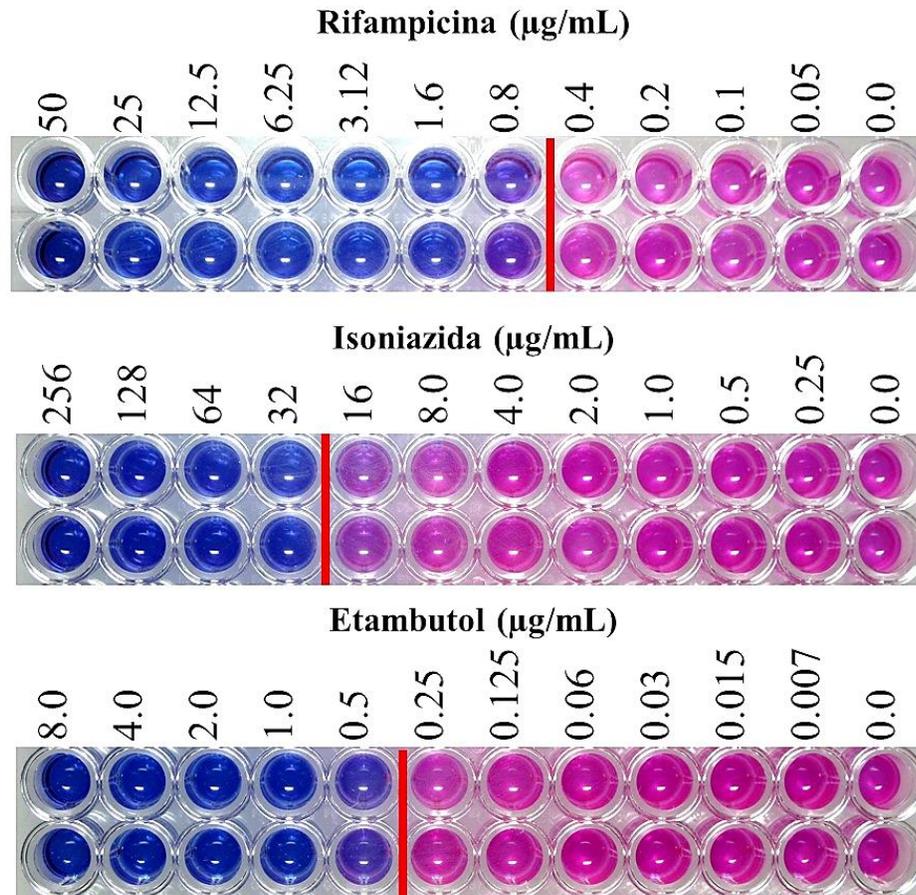


Figura 33. Ensayo de reducción de resazurina por microdilución en placa de la cepa *M. smegmatis* mc²155. Se muestran las CMI's de los fármacos RIF, INH y EMB. El ensayo se realizó por duplicado. El color rosa indica el crecimiento bacteriano. La línea roja indica el punto de corte de la CMI de cada fármaco.

Posteriormente se realizó el ensayo con las cepas *M. smegmatis*-pMV261 (control) y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, observando un pequeño incremento en la sensibilidad de la cepa transformada en RIF de 1.6 µg/mL a 0.8 µg/mL y en INH de 32 µg/mL a 16 µg/mL con respecto a la cepa control, dicho efecto se observa en uno de los duplicados del ensayo en ambos casos. Por otro lado, la CMI de EMB fue de 0.5 µg/mL en ambas cepas, por lo tanto, para este fármaco no se observó modificación al sobreexpresar los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis*, con respecto a la CMI del control (Figura 34).

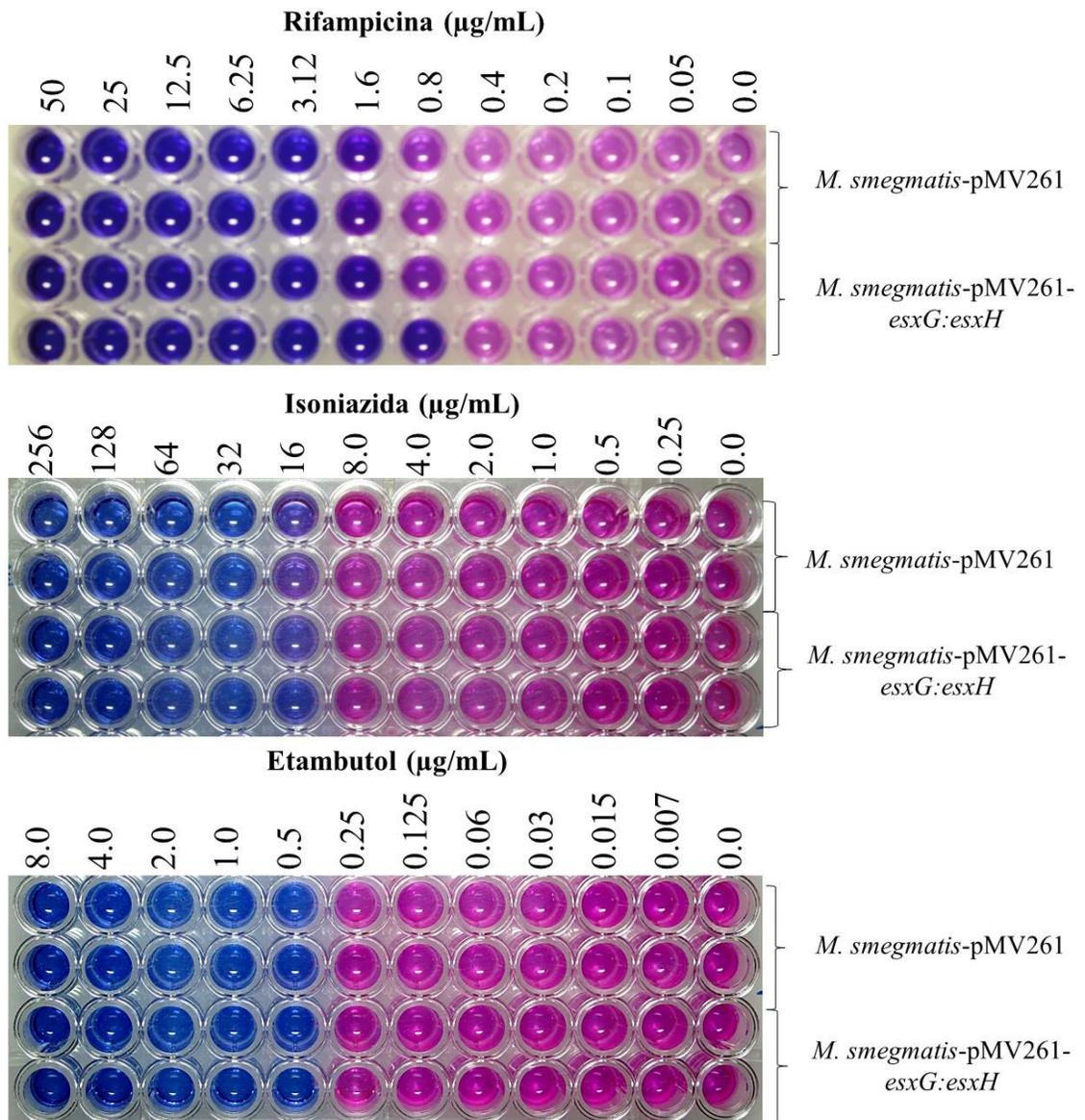


Figura 34. Ensayo de reducción de resazurina por microdilución en placa. Se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) de los fármacos RIF, INH y EMB de *M. smegmatis*-pMV261 y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*. Se utilizó kanamicina [20 µg/mL] como fármaco de selección. El ensayo se realizó por duplicado. El color rosa indica el crecimiento bacteriano.

Posteriormente se compararon los perfiles de crecimiento de *M. smegmatis*-pMV261 (control) y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* con kanamicina, ya que el vector pMV261 posee un gen de resistencia a dicho fármaco, encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las curvas de crecimiento de las dos

cepas ($p>0.05$), lo que sugiere que la sobreexpresión de estos genes no conduce a defectos de crecimiento *in vitro* (Figura 35).

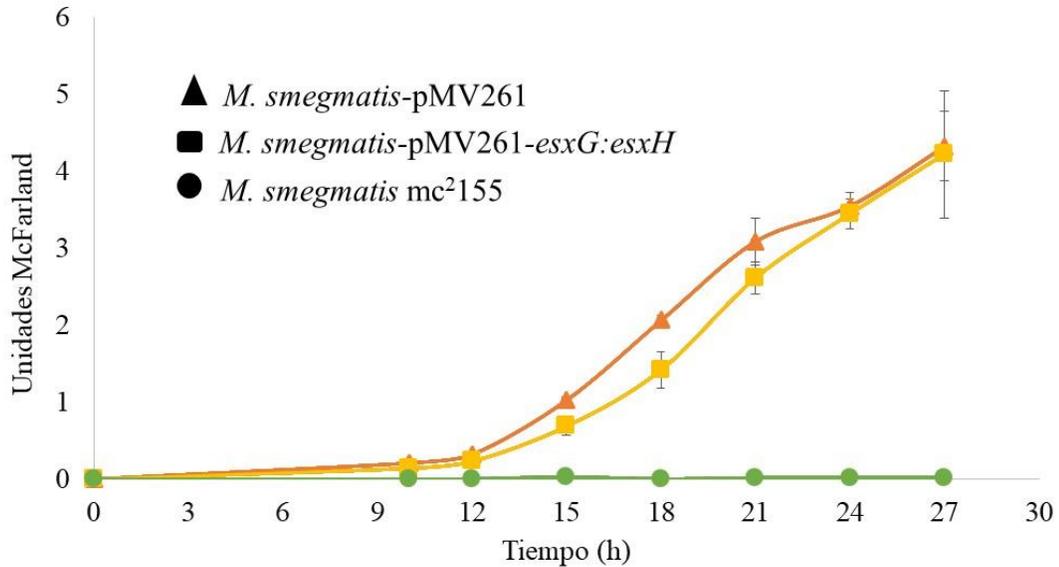


Figura 35. Curva de crecimiento. Se observa el crecimiento de ▲*M. smegmatis*-pMV261 (línea naranja), ■ *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* (línea amarilla) y ● *M. smegmatis* mc²155 (línea verde) en medio 7H9 suplementado con ADC y kanamicina [20 µg/mL]. Los ensayos se realizaron por duplicado. Las barras de error indican la desviación estándar.

Teniendo en cuenta lo anterior, y con el fin de comprobar las posibles modificaciones de las CMI's en los fármacos RIF e INH, se realizaron cinéticas de crecimiento con ambas cepas mencionadas anteriormente, con tres concentraciones diferentes del fármaco y se midió su crecimiento en unidades de McFarland cada 3 h por 27h.

En el caso del fármaco RIF, las concentraciones probadas fueron 3.12, 1.6 y 0.8 µg/mL, al graficar los resultados de las lecturas se observó una tendencia de menor crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* con respecto a la cepa control; sin embargo, estos resultados no mostraron diferencias significativas al comparar las pendientes de las curvas de crecimiento entre las dos cepas ($p>0.05$) en las tres concentraciones analizadas (Figura 36).

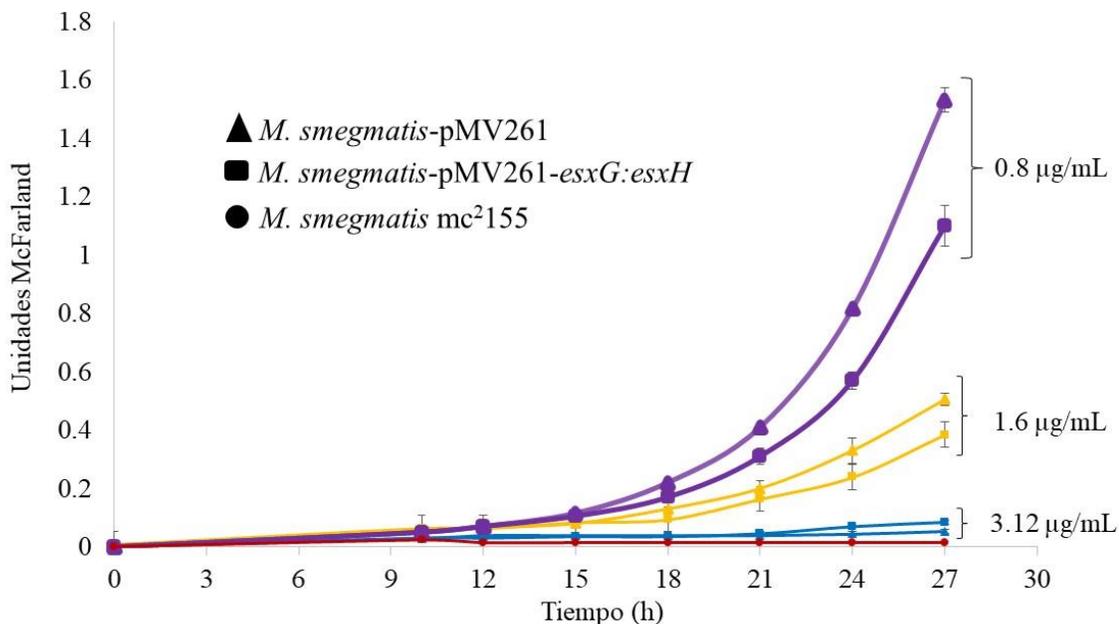


Figura 36. Curva de crecimiento con el fármaco de primera línea RIF. Se observa el crecimiento de ▲ *M. smegmatis*-pMV261 y ■ *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* con 3.12, 1.6 y 0.8 µg/mL de RIF, indicado con líneas moradas, amarillas y azules, respectivamente y el crecimiento de ● *M. smegmatis* mc²155 indicado con línea roja. Todas las cepas se inocularon en medio 7H9 suplementado con ADC y kanamicina [20 µg/mL]. Los ensayos se realizaron por duplicado y las barras de error indican la desviación estándar.

En cuanto al fármaco INH, las concentraciones probadas fueron 32, 16 y 8.0 µg/mL, así mismo, al graficar los resultados se observó una tendencia de menor crecimiento en la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* con respecto a la cepa control; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, al comparar las pendientes de las curvas de crecimiento entre las dos cepas ($p > 0.05$) en las tres concentraciones analizadas (Figura 37).

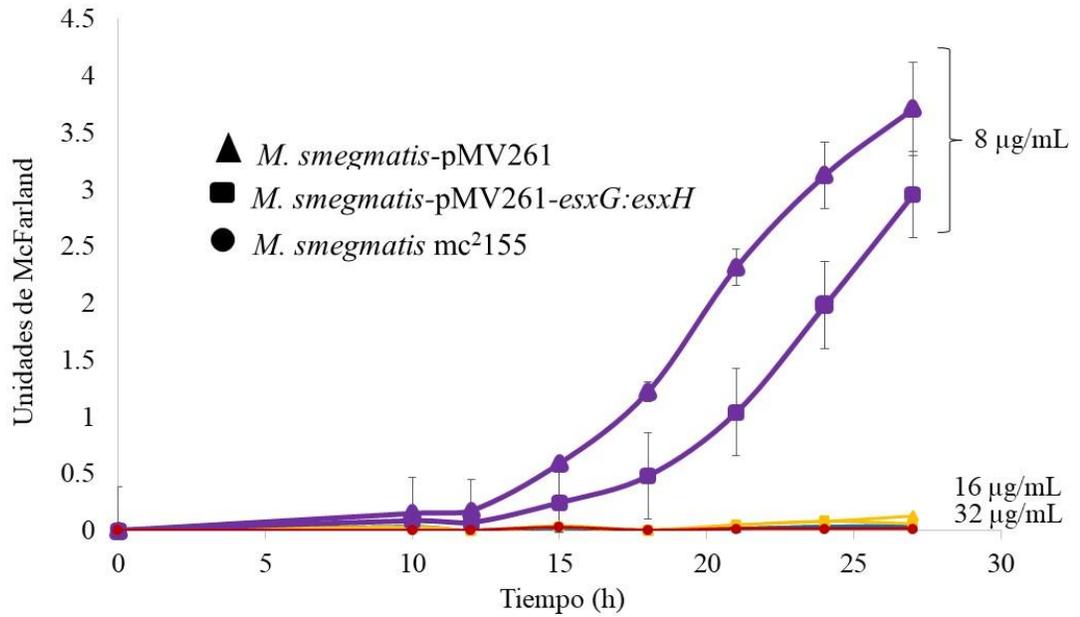


Figura 37. Curva de crecimiento con el fármaco de primera línea INH. Se observa el crecimiento de ▲ *M. smegmatis*-pMV261 y ■ *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* con 32, 16 y 8.0 µg/mL de INH, indicado con líneas moradas, amarillas y azules, respectivamente y el crecimiento de ● *M. smegmatis* mc²155 indicado con línea roja. Todas las cepas se inocularon en medio 7H9 suplementado con ADC y kanamicina [20 µg/mL]. Los ensayos se realizaron por duplicado. Las barras de error indican la desviación estándar.

8. DISCUSIÓN

A pesar de la disponibilidad de una amplia gama de fármacos para combatir la TB, el surgimiento de cepas MFR y XFR de *M. tuberculosis* ha añadido un nuevo reto al control de esta enfermedad antigua y persistente. La resistencia intrínseca y adquirida a los fármacos es el resultado de múltiples mecanismos operando simultáneamente en *M. tuberculosis* y aunque las mutaciones son la causa más común de la resistencia (Narang *et al.*, 2017), no es posible explicarla en todos los casos, por lo que se sugiere que existen otros mecanismos involucrados en este fenómeno (Shi *et al.*, 2011; Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013; Yamchi *et al.*, 2015; Narang *et al.*, 2017).

La sobreexpresión del complejo EsxG·EsxH fue realizado para evaluar su efecto en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. smegmatis*, con la finalidad de identificar si la sobreexpresión de los genes *esxG* y *esxH* es un mecanismo potencialmente involucrado en la resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*, ya que en estudios previos en el laboratorio se identificó la sobreexpresión de dichos genes en el aislado clínico MFR (CIBIN:UMF:15:99) de *M. tuberculosis* con respecto a la cepa sensible H37Rv (Peñuelas-Urquides *et al.*, 2013). El explorar y entender los distintos mecanismos de resistencia a fármacos ayudará a mejorar las técnicas disponibles para su rápida detección, seleccionar la mejor opción terapéutica y desarrollar nuevos fármacos que puedan combatir a *M. tuberculosis* (Nasiri *et al.*, 2017; Dookie *et al.*, 2018).

En el presente proyecto se utilizó como modelo de estudio *M. smegmatis* mc²155 para sobreexpresar los genes *esxG* y *esxH* de *M. tuberculosis*, debido a que el alto contenido de G+C en el DNA de *M. tuberculosis*, el uso de codones poco comunes y las preferencias de ciertos aminoácidos, pueden causar problemas al expresar las proteínas de forma recombinante en sistemas convencionales como *E. coli*, generando la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Sin embargo, estas dificultades se pueden disminuir al utilizar micobacterias no patógenas creando un sistema autólogo (Daugelat *et al.*, 2003; Goldstone *et al.*, 2008; Bashiri y Backer, 2014). Debido a esto, se ha utilizado a *M. smegmatis* ya que ambas bacterias pertenecen al mismo género, poseen maquinaria similar

de transcripción y traducción y se genera el plegamiento y modificaciones postraduccionales adecuadas (Bigi *et al.*, 1999).

Por otro lado, se demostró la expresión de los genes *esxG* y *esxH* en la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, así como la expresión y presencia de la proteína EsxG en el lisado celular y el sobrenadante del cultivo bacteriano y la presencia de la proteína EsxH en el sobrenadante del cultivo. Aunque no fue posible una clara visualización de EsxH en el lisado celular, se infiere que esta también se encuentra en la célula bacteriana, ya que se sabe que estas proteínas forman un heterodímero 1:1, el cual es secretado a través del sistema ESX-3, es decir tienen una secreción co-dependiente (Ilghari, *et al.*, 2011; Tufariello *et al.*, 2016). Es importante destacar que los anticuerpos policlonales utilizados en la presente investigación, los cuales detectan a las proteínas EsxG y EsxH no reconocen a las proteínas homologas endógenas de *M. smegmatis* mc²155.

Así mismo, la secreción de las proteínas EsxG y EsxH de *M. tuberculosis* en nuestro modelo de estudio concuerda con reportes anteriores en los que se indica que a pesar de la distancia evolutiva entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, el sistema ESX-1 de *M. smegmatis* puede secretar las proteínas EsxA y EsxB de *M. tuberculosis* (parálogas a EsxH y EsxG respectivamente), sugiriendo que el reconocimiento del sustrato esta conservado entre las especies (Converse y Cox, 2005). Mas aun, se identificó que estos motivos de secreción conservados contienen un residuo de tirosina y un residuo cargado negativamente separado por 3 aminoácidos no específicos (YxxxD/E) y está posicionado directamente en el C-terminal de una de las proteínas asociadas, por ejemplo, EsxB de EsxA/EsxB. Así mismo se ha sugerido que este motivo es una señal general de secreción en el sistema de secreción tipo VII (Daleke *et al.*, 2012). Por lo tanto, se infiere que la proteína EsxG es la que posee el motivo de secreción conservado, ya que es paróloga a la proteína EsxB del sistema ESX-1, y que esté actuando como proteína chaperona de EsxH para facilitar su secreción.

Por otro lado, la concentración mínima inhibitoria (CMI), es un indicador clave del potencial de los agentes antimicrobianos, y es definida como la concentración más baja que puede inhibir el crecimiento visible de la bacteria bajo condiciones de crecimiento definidas. Se puede determinar por el método de microdilución en placa adicionando el colorante resazurina (*resazurin microtiter assay* [REMA]) como un indicador redox, ya que las bacterias activas reducen la resazurina no fluorescente (azul) a resorufina fluorescente (rosa), dando una medida cuantificable directa de la actividad metabólica de la bacteriana (Elshikh *et al.*, 2016). Por lo tanto en la presente investigación se evaluó la sensibilidad a los fármacos de primera línea RIF, INH y EMB mediante el ensayo mencionado para la determinación de las CMI's de *M. smegmatis* mc²155, *M. smegmatis*-pMV261 y *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH*, ya que es una técnica rápida, simple, segura que puede ser adaptada para el ensayo de susceptibilidad a fármacos antituberculosos (Palomino *et al.*, 2002; Taneja y Tyagi, 2007).

Es preciso mencionar que no se determinaron las CMI para el fármaco de primera línea PZA, ya que anteriormente se ha reportado que su CMI es >200 µg/mL (Agrawal *et al.*, 2015; Arriaga-Guerrero *et al.*, 2017), debido a que *M. smegmatis* tiene resistencia intrínseca a dicho fármaco, al poseer dos enzimas con actividad pirazinamidasa codificadas por los genes *pzaA* (Boshoff y Mizrahi, 1998) y *pncA* (Guo *et al.*, 2000), que convierten el profármaco PZA en su forma activa, el ácido pirazinóico (POA), sin embargo, este no se acumula debido a una bomba efflux muy activa en *M. smegmatis* que elimina al POA de la célula eficientemente (Zhang *et al.*, 1999).

Se determinaron las CMI's de *M. smegmatis* mc²155 siendo 0.8 µg/mL para RIF, 32 µg/mL para INH y 0.5 µg/mL para EMB. La CMI de INH y EMB, coinciden con las reportadas por Arriaga-Guerrero *et al.*, en el 2017. La expresión de los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis* mc²155, no modificó las CMI's de los fármacos RIF, INH y EMB, con respecto al control (*M. smegmatis*-pMV261), esto puede deberse 1) a las diferentes funciones del sistema ESX-3 de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* y 2) que las proteínas blanco del complejo EsxG·EsxH no estén presentes o tengan una función diferente en la cepa modelo, las cuales puedan interactuar directa o indirectamente en la resistencia.

La primera hipótesis se basa en reportes que indican que el sistema ESX-3 es requerido para la utilización de hierro mediada por micobactina en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* (Siegrist *et al.*, 2009; Serafini *et al.*, 2009; Tufariello *et al.*, 2016), sin embargo, en *M. tuberculosis*, el sistema es esencial para su crecimiento *in vitro* (Tufariello *et al.*, 2016), en cambio *M. smegmatis* tolera la delección del sistema, debido a que también puede capturar el hierro utilizando el sideróforo exoquelina, que está ausente en *M. tuberculosis*, así como obtener hierro a través de porinas (Siegrist *et al.*, 2014; Jones y Niederweis, 2010). A pesar de que en *M. tuberculosis* promueve la adquisición de hierro y zinc mediado por sideróforos, en *M. smegmatis* solo promueve la homeostasis de hierro (Bosserman y Champion, 2017).

La segunda hipótesis se basa en estudios donde se indica que los sustratos (proteínas) de los sistemas ESX son co-dependientes en la secreción, ya que la eliminación génica de un sustrato evita la secreción de aquellos que sean co-dependientes de este, en cualquiera de los cinco sistemas ESX (Champion *et al.*, 2009, Fortune *et al.*, 2005; Rosenberg *et al.*, 2015; Shah y Briken, 2016, Tufariello *et al.*, 2016, Ates *et al.*, 2018). A partir de esto surge la idea general que los sustratos Esx son estrictamente necesarios para la secreción de otros sustratos del mismo sistema, quizás por una actividad similar de chaperona (Phan y Houben, 2018).

En particular, el sistema de secreción ESX-3 puede transportar sustratos adicionales a aquellos involucrados en la captación de hierro, es decir, EsxG y EsxH son co-secretados y facilitan la secreción de PE5-PPE4 (el último permanece localizado en la membrana), un par de proteínas codificadas dentro del locus *esx-3*, que quizás juntos, juegan un papel en la captación de hierro mediado por sideróforos. Así mismo, EsxG y EsxH también facilitan la secreción de PE15-PPE20, un par de proteínas codificadas fuera del locus, y ya sea juntos o separados, estas proteínas juegan un papel adicional en la virulencia (Tufariello *et al.*, 2016).

Tomando en consideración lo anterior, es posible que el complejo EsxG·EsxH tenga un papel indirecto en la resistencia al ayudar a la secreción de diferentes proteínas, tanto a las ya descritas como proteínas adicionales que permanecen sin ser dilucidadas, las cuales

indica Tufariello *et al.*, 2016, podrían permanecer asociadas a la membrana, como es el caso de PPE4 o bien ser secretadas bajo diferentes condiciones.

Así mismo, debido a que todavía no existe una idea clara del mecanismo y la jerarquía en la co-dependencia de sustratos, esto complica no solo el análisis del papel de los sustratos individuales, sino también el mecanismo de los sistemas ESX (Phan y Houben, 2018). Por lo que será importante dilucidar el mecanismo por el cual se puede relacionar a *esxG* y *esxH* como genes potencialmente involucrados en la resistencia, al observar la interacción del complejo EsxG·EsxH con otras proteínas codificadas tanto fuera como dentro del locus *esx-3* de la micobacteria, así como con proteínas de la célula hospedadora.

9. CONCLUSIONES

- ✓ Se sobreexpresaron los genes *esxG* y *esxH* utilizando la construcción pMV261-*esxG:esxH* en *M. smegmatis* mc²155.
- ✓ La sobreexpresión de los genes *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis* mc²155 no modifica la concentración mínima inhibitoria del fármaco etambutol.
- ✓ Se observó una disminución del crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-pMV261-*esxG:esxH* con respecto al crecimiento de la cepa control *M. smegmatis*-pMV261 en los cultivos en presencia de los fármacos rifampicina e isoniazida.

10. PERSPECTIVAS

- ✓ Debido a que en la investigación se trabajó con *M. smegmatis* mc²155 como cepa modelo, se propone sobreexpresar los genes *esxG* y *esxH* en *M. tuberculosis* H37Rv o H37Ra y evaluar su efecto en la resistencia a fármacos de primera línea, con el fin de confirmar su posible vinculación con el fenotipo de resistencia.

- ✓ Debido a que en nuestro grupo de trabajo se está analizando la inhibición de los genes *Msmg_0620* y *Msmeg_0621* en *M. smegmatis* mc²155, ortólogos de *esxG* y *esxH*, se propone sobreexpresar dichos genes en *M. smegmatis*, y evaluar su efecto en la resistencia a fármacos de primera línea, con el fin de confirmar su posible vinculación con el fenotipo de resistencia.

- ✓ Debido a que los genes *esxG* y *esxH* son parte del locus *esx-3* el cual codifica para el sistema de secreción ESX-3 en *M. tuberculosis*, se propone evaluar la participación de algunos componentes del sistema de secreción ESX-3 (ej. EccC, EccD) en el fenómeno de farmacorresistencia en *M. smegmatis* mc²155, con el fin de identificar su posible vinculación con el fenotipo de resistencia.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. 2014. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 369:20130428.
- Agrawal P, Miryala S, Varshney U. 2015. Use of *Mycobacterium smegmatis* Deficient in ADP-Ribosyltransferase as Surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in Drug Testing and Mutation Analysis. *PLoS One* 10:e0122076.
- Alexander AK, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases* 16:1296-1299.
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1785–1789.
- Arriaga-Guerrero A. 2016. Efecto de la expresión de la lipasa LipF en la resistencia a fármacos de primera línea en un modelo experimental de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León
- Ates LS, Houben ENG, Bitter W. 2016. Type VII secretion: a highly versatile secretion system. *Microbiology Spectrum* 4:VMBF-0011-2015.
- Bardou, F, Raynaud, C, Ramos, C, Laneelle, M. A, & Laneelle, G. 1998. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 144:2539–44.
- Bashiri G, Baker EN. 2014. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. *The Protein Society* 24:1-10.
- Bashiri G, Squire CJ, Baker EN, Moreland NJ. 2007. Expression, purification and crystallization of native and selenomethionine labeled *Mycobacterium tuberculosis* FGD1 (Rv0407) using a *Mycobacterium smegmatis* expression system. *Protein Expression and Purification* 54:38–44.
- Bigi F, Taboga O, Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Cataldi AA. 1999. Expression of the *Mycobacterium bovis* P36 gene in *Mycobacterium smegmatis* and the

baculovirus/insect cell system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32:29-37.

- Bonifaz JA. 2012. Micología Médica Básica. McGRAW-HILL, México D.F., pp-35, ISBN: 978-607-15-0744-0.
- Boshoff HI, Mizrahi V. 1998. Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology 180:5809-14.
- Bosserman RE, Champion PA. 2017. ESX systems and the Mycobacterial Cell Envelope: What's the connection?. Journal of Microbiology 199:e00131-17.
- Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. 2004. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends in Microbiology 12:500–508.
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. Cell 10:901–912.
- CENAPRECE. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. 2017. Programas preventivos dirección de micobacteriosis. Cifras oficiales tuberculosis. Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología. SS.
- Champion PA, Champion MM, Manzanillo P, Cox JS. 2009. ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria. Molecular Microbiology 73: 950-962.
- Converse SE, Cox JS. 2005. A Protein Secretion Pathway Critical for *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Is Conserved and Functional in *Mycobacterium smegmatis*. Journal Of Bacteriology 187:1238–1245
- Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:1305–1314.

- Cruz AT, Starke JR. 2007. Clinical manifestations of tuberculosis in children. *Paediatric Respiratory Reviews* 8:107–117.
- Daugelat S, Kowall J, Mattow J, Bumann D, Winter R, Hurwitz R, Kaufmann S. 2003. The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization. *Microbes and Infection* 5:1082–1095.
- Daleke MH, Ummelsa R, Bawonoc P, Heringac J, Vandenbroucke-Graulsa C, Luirinkb J, Wilbert Bittera W. 2012. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:11342-7.
- Dessen A, Quémar A, Blanchard JS, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. 1995. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 267:1638-41.
- Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. 2018. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73:1138-1151.
- Edwards D, Kirkpatrick CH. 1986. The Immunology of Mycobacterial Diseases. *American Review of Respiratory Disease* 134:1062-1071.
- Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat IM. 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters* 38:1015–1019.
- Etienne G, Laval F, Villeneuve C, Dinadayala P, Abouwarda A, Zerbib D, Galamba A, Daffe M. 2005. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* MC²155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* 151:2075–2086.
- Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sassetti CM, Sherman DR, Bloom BR, Rubin EJ. 2005. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:10676-10681.

- Gey Van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD. 2001. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biology* 2:research0044.1-0044.1.
- Gillespie, S.H. 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46:267–274.
- Goldstone RM, Moreland NJ, Bashiri G, Baker EN, Shaun Lott JS. 2008. A new Gateway vector and expression protocol for fast and efficient recombinant protein expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Expression and Purification* 7:57-81.
- González-Escalante L, Peñuelas-Urquides K, Said-Fernández S, Silva-Ramirez B, de León MB. 2015. Differential expression of putative drug resistance genes in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *FEMS microbiology letters* 362:fnv194.
- Granados-Tristán A. 2017. Análisis comparativo de secuencias de los genes *esxG* y *esxH* potencialmente involucrados en fármacorresistencia de una cepa sensible y una multifármacorresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.
- Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, Majlessi L, Brosch R. 2016. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nature Reviews* 14:677-691.
- Guirado E, Schlesinger LS. 2013. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma—the critical battlefield in host immunity and disease. *Frontiers in immunology* 4:1-7.
- Guo M, Sun Z, Zhang Y. 2000. *Mycobacterium smegmatis* Has Two Pyrazinamidase Enzymes, PncA and PzaA. *Journal of Bacteriology* 182:3881–3884.
- Houben D, Demangel C, Van Ingen J, Pérez J, Baldeón L, Abdallah AM, Caleechurn L, Bottai D, Van Zon M, De Punder K, Van der Laan T, Kant A, Bossers-de Vries R, Willemsen P, Bitter W, Van Soolingen D, Brosch R, Van der Wel N, Peters PJ. 2012. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cellular microbiology* 14:1287–1298.

- Houben EN, Korotkov KV, Bitter W. 2014. Take five-type VII secretion systems of mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1844:1707–1716.
- Ilghari D, Lightbody KL, Veverka V, Waters LC, Muskett FW, Renshaw PS, Carr MD. 2011. Solution structure of the *Mycobacterium tuberculosis* EsxG-EsxH complex: functional implications and comparisons with other *M. tuberculosis* Esx family complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 286:29993–30002.
- Jnawali HN, Ryoo S. 2013. First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance. In: *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*, Bassam H. Mahboub BH and Vats MG (eds). InTech. ISBN 978-953-51-1049-1
- Johnsson K, King D, Schultz P. 1995. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society* 117:5009–5010.
- Jones CM, Niederweis M. 2010. Role of porins in iron uptake by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* 192:6411–6417.
- Konno K, Feldmann FM, Mcdermott W. 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *The American Review of Respiratory Disease* 95:461-9.
- Kunnath-Velayudhan S, Porcelli SA. 2013. Recent advances in defining the immunoproteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology* 4:1-6.
- Larsen MH, Biermann K, & Jacobs, Jr WR. 2007. Analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Proteins. *Current Protocols in Microbiology* 6:10A.4.1-10A.4.5.
- Lehmann KB, Neumann R. 1896. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik*. Munich.
- Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. 2011. TubercuList - 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)* 91:1-7.
- Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. 2012. *Harrison, Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill pp. 539-560.
- Lozano, JA. 2002. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Revista Offarm Revista de la oficina de Farmacia* 21:102-110.

- Maciag A, Dainese E, Rodríguez, GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palu G, Riccardi G, Manganelli R. 2007. Global Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) Regulon. *Journal of Bacteriology* 189:730–740.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2009. Brock. *Biología de los Microorganismos*. PEARSON EDUCACIÓN: Madrid, España, pp. 504-507. ISBN: 978-84-7829-136-6.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology* 178:1274-1282.
- Mahmood T, Yang PC. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4:429-434.
- Mehra A, Zahra A, Thompson V, Sirisaengtaksin N, Wells A, Porto M, Koster S, Penberthy K, Kubota Y, Dricot A, Rogan D, Vidal M, Hill DE, Bean AJ, Philip JA. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathogens* 9:e1003734.
- Mitchison DA. 1979. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 76:771–781.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2013. *Microbiología Médica*. S.A. Elsevier España, pp. 235-247. ISBN: 978-0-323-08692-9.
- Narang A, Giri A, Gupta S, Garima K, Bose M, Varma-Basil M. 2017. Contribution of putative efflux pump genes to isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Mycobacteriology* 6:177-83.
- Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, Goudarzi H, Pormohammad A, Fooladi AA, Feizabadi MM. 2017. New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Frontiers in Microbiology* 8:681.
- Nguyen L. 2016. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of Toxicology* 90:1585-1604.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013. Para la prevención y control de la tuberculosis. Secretaría de Salud.
- Organización Mundial de la Salud. 2017. *Global Tuberculosis Report 2018*. ISBN 978-92-4-156564-6

- Organización Mundial de la Salud. 2017. Global Tuberculosis Report 2017. ISBN 978-92-4-156551-6
- Organización Mundial de la Salud. 2013. Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. ISBN 978 92 4 350463 6
- Organización Mundial de la Salud. 2010. Treatment of tuberculosis Guidelines. Cuarta edición. ISBN 9789241547833.
- Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, Ginsberg A, Swaminathan S, Spigelman M, Getahun H, Menzies D, Raviglioni M. 2016. Tuberculosis. Nature Reviews 2:1-26.
- Pallen MJ. 2002. The ESAT-6/WXG100 superfamily – and a new Gram-positive secretion system? Trends in Microbiology 10:209–212.
- Palomino J, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J. 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 2720–2722.
- Pandey R, Russo R, Ghanny S, Huang X, Helmann J, Rodríguez GM. 2015. MntR (Rv2788): a transcriptional regulator that controls manganese homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology 98:1168–1183.
- Phan TH, Houben EN. Bacterial secretion chaperones; the mycobacterial type VII case. FEMS Microbiology Letters 365:fny197.
- Parsons S, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Robin M, Warren RM, van Helden PD. 2013. Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. Emerging Infectious Diseases 19:2004-2007.
- Peñuelas-Urquides K, González-Escalante L, Villarreal-Treviño L, Silva-Ramírez B, Gutiérrez-Fuentes DJ, Mojica-Espinosa R, Rangel-Escareño C, Uribe-Figueroa L, Molina-Salinas GM, Dávila-Velderrain J, Castorena-Torres F, Bermúdez de León M, Said-Fernández S. 2013. Comparison of Gene Expression Profiles Between Pansensitive and Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Current Microbiology 67:362-71.

- Ramaswamy S, Musser JM. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease* 79: 3-29.
- Reddy TB, Riley R, Wymore F, Montgomery P, De Caprio D, Engels R, Gellesch M, Hubble J, Jen D, Jin H, Koehrsen M, Larson L, Mao M, Nitzberg M, Sisk P, Stolte C, Weiner B, White J, Zacharia M, Zachariah Z, Sherlock G, Galagan JE, Ball CA, Schoolnik GK. 2009. TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic Acids Research* 37(Database issue): D499–D508.
- Reyrat JM, Kahn D. 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis?. *Trends in Microbiology* 9: 472-473.
- Pfyffer GE, Wittwer F. 2012. Incubation Time of Mycobacterial Cultures: How Long Is Long Enough To Issue a Final Negative Report to the Clinician?. *Journal of Clinical Microbiology* 50:4188 – 4189
- Rodríguez GM, Voskuil MI, Gold B, Schoolnik GK, Smith I. 2002. *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infection and Immunity* 70:3371–3381.
- Rosenberg OS, Dovala D, Li X, Connolly L, Bendebury A, Finer-Moore J, Holton J, Cheng Y, Stroud RM, Cox JS. 2015. Substrates control multimerization and activation of the multi-domain ATPase motor of type VII secretion. *Cell* 161:501-512.
- Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 279:98–102.
- Ruiz P, Rodríguez-Cano F, Zerolo FJ, Casal M. 2002. Investigation of the In Vitro Activity of Streptomycin Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance* 8:147-149.
- Sambrook JF, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York pp 1.32-1.34.
- Scorpio A, Zhang Y. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine* 2:662–667.

- Serafini A, Boldrin F, Palu G, Manganeli R. 2009. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. *Journal of Bacteriology* 191: 6340-6344.
- Shah S, Briken V. 2016. Modular Organization of the ESX-5 Secretion System in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6:49.
- Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, Wang H, Zhang W, Zhang Y. 2011. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 333:1630-1632.
- Siegrist MS, Unnikrishnan M, McConnell MJ, Borowsky M, Cheng TY, Siddiqi N, Fortune SM, Moody DB, Rubin EJ. 2009. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:18792–18797.
- Siegrist MS, Steigedal M, Ahmad R, Mehra A, Dragset MS, Schuster BM, Philips JA, Carr SA, Rubin EJ. 2014. Mycobacterial Esx-3 requires multiple components for iron acquisition. *mBio* 5:e01073-14.
- SINAVE/DGE/Salud. 2018. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información.
- Skjot RL, Inger Brock I, Arend SM, Munk ME, Theisen M, Ottenhoff TH, Andersen P. 2002. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family. *Infection and Immunity* 70:5446–5453.
- Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 6:463–496.
- Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology* 4:1911-1919.
- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR Jr, Telenti A, Musser JM. 1997. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of *embB* mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41:1677–1681.

- Strover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, Snapper SB, Barletta RG, Jacobs WR Jr, Bloom BR. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351:456-460.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russel DG. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-681.
- Taneja NK, Tyagi JS. 2007. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60:288–293.
- Tekaiia F, Gordon SV, Garnier T, Brosch R, Barrell BG, Cole ST. 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tubercle and Lung Disease* 79:329–342.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341:647–550.
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr. 1997. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine* 3:567-70.
- Tiwari BM, Kannan N, Vemu L, Raghunand TR. 2012. The *Mycobacterium tuberculosis* PE Proteins Rv0285 and Rv1386 Modulate Innate Immunity and Mediate Bacillary Survival in Macrophages. *PLoS ONE* 7:e51686.
- Tufariello JM, Chapman JR, Kerantzasa CA, Wong KW, Vilchèze C, Jones CM, Colea LE, Tinaztepe E, Thompson V, Fenyöh D, Niederweis M, Ueberheide B, Philips JA, Jacobs WR Jr. 2016. Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 11:E348–E357.
- Uplekar S, Heym B, Friocourt V, Rougemont J, Cole ST. 2011. Comparative Genomics of *esx* Genes from Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

Provides Evidence for Gene Conversion and Epitope Variation. *Infection and Immunity* 79:4042–4049.

- van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, y van Soolingen D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. *Emerging Infectious Diseases* 18:653-655.
- Velayati AA, Farnia P. 2017. Atlas of *Mycobacterium tuberculosis*. Elsevier. ISBN: 978-0-12-803808-6.
- Vilchèze C, Jacobs WR Jr. 2007. The mechanism of isoniazid killing: Clarity through the scope of genetics. *Annual Review of Microbiology* 61:35–50.
- Vilchèze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazbón MH, Wang F, Alland D, Sachettini JC, Jacobs WR Jr. 2005. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:708–720.
- Yamchi JK, Haeili M, Feyisa SG, Kazemian H, Shahraki AH, Zahednamazi F, Fooladi AA, Feizabadi MM. 2015. Evaluation of efflux pump gene expression among drug susceptible and drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran. *Infections, Genetics and Evolution* 36:23–26.
- Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. 1999. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. *Journal of Bacteriology* 181:2044-2049.
- Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. 2013. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*. 2:1–12.

12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Alejandra Borrego Loya

Candidata para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: **EFEECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL COMPLEJO EsxG·EsxH EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN *Mycobacterium smegmatis* COMO MODELO EXPERIMENTAL DE *M. tuberculosis***

Campo de Estudio: Microbiología Molecular.

Datos Personales: Nacida en Hidalgo del Parral, Chihuahua el 20 de enero de 1993, hija de Fernando Borrego Soto y Sofía Irene Loya Campuzano.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Grado obtenido Licenciada Química Bacterióloga Parasitóloga.